



**You have downloaded a document from**  
**RE-BUS**  
**repository of the University of Silesia in Katowice**

**Title:** Automatyczne metody analizy orientacji mikrotubul

**Author:** Zygmunt Wróbel, Robert Koprowski

**Citation style:** Wróbel Zygmunt, Koprowski Robert. (2007). Automatyczne metody analizy orientacji mikrotubul. Katowice: Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego



Uznanie autorstwa - Użycie niekomercyjne - Bez utworów zależnych Polska - Licencja ta zezwala na rozpowszechnianie, przedstawianie i wykonywanie utworu jedynie w celach niekomercyjnych oraz pod warunkiem zachowania go w oryginalnej postaci (nie tworzenia utworów zależnych).



UNIwersYTET ŚLĄSKI  
W KATOWICACH



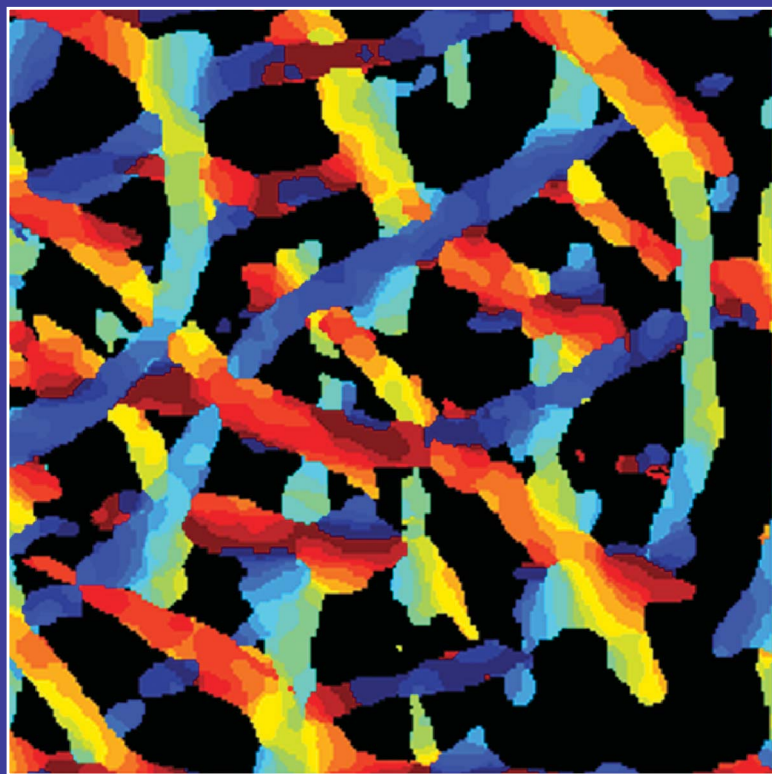
Biblioteka  
Uniwersytetu Śląskiego



Ministerstwo Nauki  
i Szkolnictwa Wyższego

Zygmunt Wróbel, Robert Koprowski

# AUTOMATYCZNE METODY ANALIZY ORIENTACJI MIKROTUBUL



AUTOMATYCZNE  
METODY ANALIZY  
ORIENTACJI MIKROTUBUL



NR 2574



40 LAT  
UNIWERSYTETU  
ŚLĄSKIEGO



Zygmunt Wróbel, Robert Koprowski

# AUTOMATYCZNE METODY ANALIZY ORIENTACJI MIKROTUBUL



Redaktor serii: Informacja Naukowo-Techniczna  
Andrzej Szewc

Recenzent  
Juliusz L. Kulikowski

Tytuł dofinansowany przez Komitet Badań Naukowych  
w ramach grantu nr N518 005 31/0336  
*Metody analizy i przetwarzania obrazów w zastosowaniu do wyznaczania kąta  
nachylenia mikrotubul*

Redaktor: Grażyna Wojdała

Redaktor techniczny: Barbara Arenhövel

Korektor: Lidia Szumigała

Copyright © 2007  
by Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego  
Wszelkie prawa zastrzeżone

**ISSN 0208-6336**  
**ISBN 978-83-226-1719-9**

Wydawca  
**Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego**  
**ul. Bankowa 12B, 40-007 Katowice**  
[www.wydawnictwo.us.edu.pl](http://www.wydawnictwo.us.edu.pl)  
e-mail: [wydawus@us.edu.pl](mailto:wydawus@us.edu.pl)

---

Wydanie I. Nakład: 100 + 50 egz. Ark. druk. 7,5. Ark. wyd. 8,0.  
Przekazano do składu we wrześniu 2007 r. Podpisano do druku  
w listopadzie 2007 r. Papier offset. kl. III, 80 g

Cena 14 zł

---

Lamanie: Pracownia Składu Komputerowego  
Wydawnictwa Uniwersytetu Śląskiego  
Druk i oprawa: Czerny Marian. Firma Prywatna GREG  
Zakład Poligraficzny, ul. Wrocławska 10, 44-100 Gliwice

## SPIS TREŚCI

WYKAZ WAŻNIEJSZYCH OZNACZEŃ . . . . .	7
1. WPROWADZENIE. . . . .	9
2. OBRAZY MIKROTUBUL . . . . .	12
2.1. Mikrotubula – podstawowe dane biologiczne . . . . .	12
2.2. Algorytmy analizy obiektów wydłużonych . . . . .	14
3. ALGORYTMY DO POMIARU KĄTA NACHYLENIA MIKROTUBUL . . . . .	17
3.1. Mikrotubule i ich geometryczne przybliżenie . . . . .	17
3.2. Wstępne przetwarzanie obrazu . . . . .	21
3.3. Idea oraz algorytm pomiaru stopnia nachylenia mikrotubul . . . . .	22
3.4. Optymalizacja algorytmu . . . . .	32
3.5. Zastosowanie operacji szkieletyzacji dla mikrotubul . . . . .	37
3.6. Analiza kąta nachylenia komórek . . . . .	39
4. WŁASNOŚCI OPRACOWANEGO ALGORYTMU . . . . .	45
4.1. Przybliżenie mikrotubuli prostą . . . . .	45
4.2. Metodyka pomiaru własności algorytmów. . . . .	50
4.2.1. Generator losowy obiektów wydłużonych . . . . .	51
4.2.2. Analiza histogramów . . . . .	53
4.3. Parametry opracowanych algorytmów . . . . .	54
4.3.1. Wpływ zmian rozmiaru maski $h$ . . . . .	54
4.3.2. Wpływ zmian progu $p_r$ . . . . .	56
4.3.3. Wpływ liczby obiektów na scenie . . . . .	58
4.3.4. Wpływ kąta nachylenia obiektów na scenie . . . . .	59
4.3.5. Wpływ doboru kroku działania algorytmu . . . . .	60
4.4. Podsumowanie . . . . .	61
5. ANALIZA ZMIENNOŚCI KĄTA NACHYLENIA MIKROTUBUL . . . . .	62
5.1. Obszarowa analiza kąta nachylenia mikrotubul . . . . .	62

5.2. Typy histogramów mikrotubul . . . . .	67
5.3. Podsumowanie . . . . .	72
6. REKONSTRUKCJA MIKROTUBUL NA PODSTAWIE SEKWENCJI ICH OBRAZÓW . . . . .	76
6.1. Wprowadzenie . . . . .	76
6.2. Nakładanie sekwencji obrazów . . . . .	77
7. POLE KIERUNKU W ANALIZIE OBIEKTÓW CYLINDRYCZNYCH . . . . .	82
7.1. Wprowadzenie . . . . .	82
7.2. Analiza konturów obiektów cylindrycznych . . . . .	83
7.3. Analiza obiektów cylindrycznych . . . . .	88
7.3.1. Wyznaczenie obszaru poddawanego analizie . . . . .	88
7.3.2. Rekonstrukcja konturu obiektu cylindrycznego . . . . .	93
7.4. Przykładowe zastosowanie . . . . .	97
8. ANALIZA OKRESOWOŚCI PROTOFILAMENTÓW W POPRZECZNYM OBRAZIE MIKROTUBULI . . . . .	99
8.1. Wprowadzenie . . . . .	99
8.2. Liczba protofilamentów w poprzecznym obrazie mikrotubuli . . . . .	100
8.3. Okresowości protofilamentów w poprzecznym obrazie mikrotubuli . . . . .	105
8.3.1. Szybka transformata Fouriera . . . . .	105
8.3.2. Optymalizacja simpleksowa . . . . .	107
8.3.3. Filtracja filtrem Butterwortha . . . . .	110
8.3.4. Inne możliwe podejścia . . . . .	114
8.4. Podsumowanie . . . . .	115
9. LITERATURA . . . . .	116
Summary . . . . .	119
Резюме . . . . .	120

## WYKAZ WAŻNIEJSZYCH OZNACZEŃ

$\alpha$	— kąt nachylenia mikrotubuli w podejściu lokalnym (kąt nachylenia stycznej w danym punkcie mikrotubuli),
$\varphi$	— kąt nachylenia mikrotubuli w podejściu globalnym (kąt nachylenia prostej przybliżającej kąt nachylenia całej mikrotubuli),
$\theta$	— kąt orientacji maski,
TH	— transformata Hougha,
$m, n$	— współrzędne piksela: $m$ — wiersz, $n$ — kolumna,
$M, N$	— rozdzielczość obrazu: $M$ — liczba wierszy, $N$ — liczba kolumn,
$L_{\text{GRAY}}$	— obraz monochromatyczny,
$L_{\text{RGB}}$	— obraz kolorowy RGB,
$L_{\text{HSV}}$	— obraz kolorowy HSV,
$L_{\text{GX}}$	— obraz gradientu w osi $ox$ ,
$L_{\text{GY}}$	— obraz gradientu w osi $oy$ ,
$L_{\alpha}$	— obraz wartości kątowych,
$A_m$	— amplituda,
$m_h, n_h$	— położenie pikseli w masce $h$ ,
$p_r, p_{rr}$	— progi,
$\lambda_n$	— znormalizowany kąt nachylenia $\lambda$ do przedziału $(0,1)$ ,
$\lambda_{na}$	— znormalizowany kąt nachylenia $\lambda_a$ do przedziału $(0,1)$ ,
$\lambda_{nb}$	— znormalizowany kąt nachylenia $\lambda_b$ do przedziału $(0,1)$ ,
$\varepsilon_{mi}, \varepsilon_{ma}$	— stałe, wartości maksymalne i minimalne maski $h$ ,
$\sigma_h$	— odchylenie standardowe średniej maski $h$ .

Pozostałe oznaczenia używane w tekście są pochodnymi tu wymienionych.

# 1. WPROWADZENIE

Przeważająca część informacji o otaczającym świecie dociera do nas za pośrednictwem wzroku. Nic więc dziwnego, że w dobie szybkiego rozwoju informatyki podejmuje się intensywne próby automatyzacji analizy i przetwarzania obrazów, używając do tego celu komputerów. Nasz zmysł wzroku z pewnością przewyższa komputer w interpretacji obrazu, komputer natomiast jest jednoznaczny w swych decyzjach. Poza tym komputer może powtarzać te same czynności setki lub tysiące razy, nie odczuwając przy tym zmęczenia monotonną pracą.

Proces uczenia komputera analizy i przetwarzania obrazów stał się dopiero wtedy możliwy, kiedy wprowadzono cyfrowy zapis obrazu, a także kiedy pojawiły się wystarczająco wydajne procesory oraz duże pamięci mogące zapisywać i analizować wprowadzone obrazy. Analiza i przetwarzanie obrazów obecnie znalazły zastosowanie w wielu dziedzinach życia [39]. Są to między innymi: automatyka, kryminalistyka, geodezja i kartografia, medycyna, komunikacja, wojskowość, astronomia i astrofizyka, metrologia. W związku z tym zapotrzebowaniem na polskim rynku pojawiło się kilka znakomitych pozycji książkowych poświęconych podstawom teoretycznym komputerowej analizy przetwarzania oraz rozpoznawaniu obrazów mogących mieć zastosowanie we wspomnianych dziedzinach (np.: [20], [26], [29], [39], [46], [47], [48], [49]). Z kolei analizę i przetwarzanie obrazów biomedycznych, ściśle związane z niniejszą pracą, przedstawiono obszernie w [56].

Autorzy mają nadzieję, że niniejsza monografia będzie szczególnie pomocna biologom, utwierdzając ich w przekonaniu, że wiele pracochłonnych pomiarów może za nich wykonać profilowany program komputerowej analizy obrazu, pozostawiając im tylko interpretację uzyskanych wyników. Algorytmy analizy i przetwarzania obrazów wykorzystane w tej grupie badań owocują nie tylko ilościowymi wynikami, lecz także pełną automatyką pomiarów, co znacznie przyspiesza proces badań, jak też czyni je powtarzalnymi.

Celem niniejszej monografii są:

- opracowanie metody automatycznego wyznaczania kąta nachylenia mikrotubul,
- opracowanie metody przestrzennej rekonstrukcji mikrotubul,
- opracowanie metody wyznaczania przestrzennego rozłożenia protofilamentów w poprzecznym obrazie mikrotubuli.

W rozdziale drugim omówiono podstawowe własności mikrotubul jako obiektów wydłużonych, przedstawiono też literaturę dotyczącą analizy i przetwarzania obiektów wydłużonych. W trzecim rozdziale monografii zaprezentowano akwizycję i wstępne przetwarzanie obrazów mikrotubul. Pokazano różne typy mikrotubul (obiektów wydłużonych) oraz zaproponowano ich geometryczne przybliżenie w postaci 1-globalnego i 2-globalnego przybliżenia oraz przybliżenia lokalnego. Zaproponowano trzy autorskie algorytmy do pomiaru kąta nachylenia mikrotubul jako obiektów wydłużonych, omawiając ich zasadę działania i ukazując podstawowe matematyczne zależności. Tematem czwartego rozdziału jest metodyka pomiaru własności metrologicznych opracowanych algorytmów. Zbadano, jak na dokładność pomiaru kąta nachylenia mikrotubul, z uwzględnieniem ich pól powierzchni, wpływa wybór odpowiedniej implementacji algorytmu, a w szczególności: rozmiar stosowanej maski, zmiana progu, wpływ liczby obiektów na obrazie, wpływ nachylenia obiektów na obrazie, wpływ wielkości kroku działania algorytmu. W rozdziale piątym omówiono automatyczną metodę pomiaru kąta nachylenia mikrotubul. Uzyskane wyniki umożliwiły wyznaczenie histogramu kąta nachylenia mikrotubul, z uwzględnieniem ich pól powierzchni. Dodatkowo omówiono użycie zaproponowanego algorytmu w analizie zmienności kąta nachylenia mikrotubul jako pewnego rodzaju trendu w komórce. Analiza tego typu będzie przeprowadzana w zadeklarowanym obszarze, pozwalając na uzyskanie wskaźników globalnych kąta nachylenia. W rozdziale szóstym pokazano możliwość przestrzennej trójwymiarowej rekonstrukcji mikrotubul na podstawie sekwencji obrazów uzyskiwanych z mikroskopu fluorescencyjnego, z wykorzystaniem możliwości zmiany głębi ostrości. W rozdziale siódmym przedstawiono nowe podejście do zagadnienia pola kierunku. Podano nowe możliwości zastosowania teorii pola kierunku do analizy obiektów cylindrycznych. W ostatnim, ósmym rozdziale dokonano analizy okresowości protofilamentów występujących w poprzecznym obrazie mikrotubul. Pokazano różne możliwe podejścia do tego zagadnienia. Zaprezentowano otrzymane wyniki, które pozwoliły na obliczenie liczby protofilamentów w mikrotubuli.

Implementację opisywanych w pracy algorytmów prowadzono w programie Matlab w pakiecie Image Processing. Informacje o programie Matlab można znaleźć między innymi w pracach [13], [44], [45], [48], [49].

*Autorzy bardzo dziękują Panom prof. dr. hab. Zbigniewowi Hejnowiczowi oraz dr. hab. Jerzemu Nakielskiemu z Katedry Biofizyki i Biologii Wydziału*

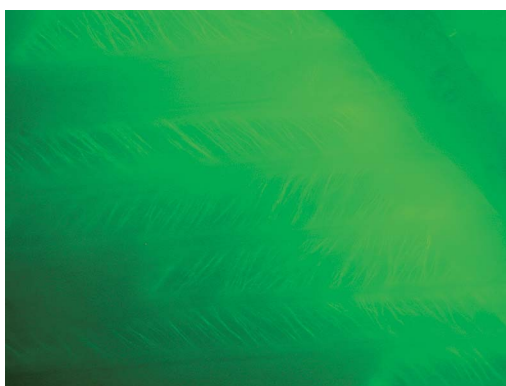
*Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach za udostępnienie obrazów mikrotubul oraz cenną dyskusję w czasie powstawania niniejszej monografii.*

*Autorzy pragną też podziękować Pani prof. dr hab. Marii Kwiatkowskiej z Katedry Cytofizjologii Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego za udostępnienie obrazów protofilamentów wykorzystanych w rozdziale ósmym książki.*

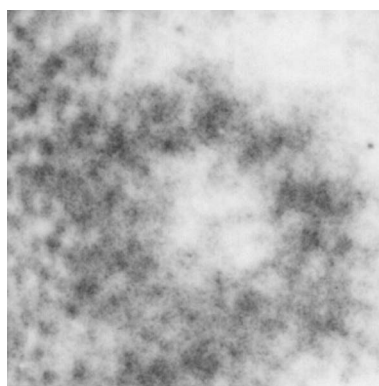


## 2. OBRAZY MIKROTUBUL

Na rys. 2.1 pokazano przykładowe obrazy mikrotubul, jakie biolog uzyskuje w mikroskopie. Są to dwa obrazy: pierwszy — ilustrujący ułożenie mikrotubul w komórkach, oraz drugi — będący poprzecznym obrazem mikrotubuli, na którym widać ułożenie protofilamentów.



obraz mikrotubul



obraz protofilamentów

Rys. 2.1. Obraz mikrotubul i obraz protofilamentów

Na tych obrazach będą prezentowane własności algorytmów opracowanych w niniejszej monografii.

### 2.1. Mikrotubula — podstawowe dane biologiczne

Mikrotubule są istotnymi składnikami cytoszkieletu komórek eukariotycznych [10], [21], które wraz z mikrofilamentami aktynowymi wpływają na prze-

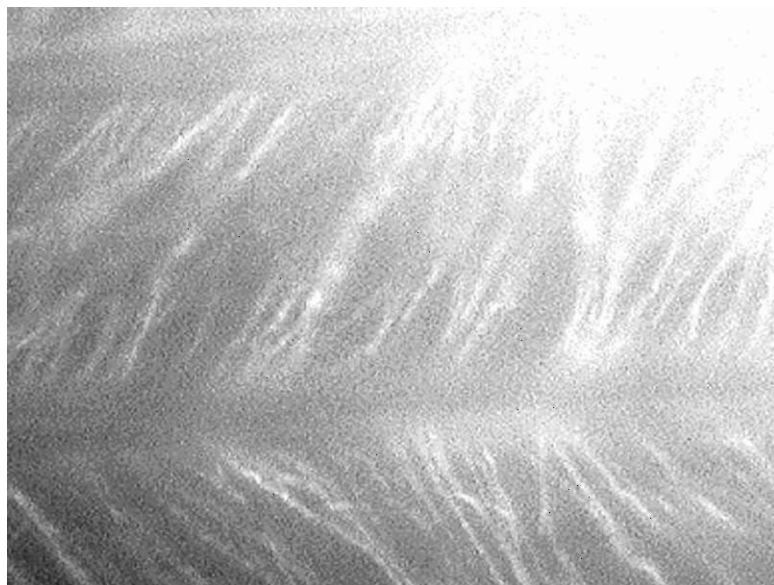
strzezną organizację cytoplazmy i zachodzące w niej zmiany. Mikrotubule spełniają wiele różnorodnych funkcji, między innymi współtworzą geometrię komórek, ułatwiają transport makromolekuł w obrębie cytoplazmy, a jako strukturalny element wrzeciona podziałowego są odpowiedzialne za segregację materiału genetycznego przekazywanego komórkom potomnym. Pod względem budowy przypominają cienkie rurki grubości ok. 25 nm i długości 10—25  $\mu\text{m}$ , składające się najczęściej z 13 przylegających do siebie, równolegle ułożonych i nieco spiralnie skręconych protofilamentów (polimerów białka — tubuliny). Dzięki tym strukturom komórki mają różne — czasem zmienne — kształty (ruch ameboidalny), także dzięki nim organelle komórkowe mogą ulegać przemieszczeniu. Jako wydłużone pasemka mające charakterystyczną orientację w przestrzeni, w obrazach analizowanych w pracy są ułożone zazwyczaj skośnie w stosunku do długiej osi komórki [9], [10], [11]. Zmiana orientacji mikrotubul w zależności od naprężeń jest przedmiotem badań specjalistów z zakresu biologii komórki — w tym przypadku mierzy się ich kąt nachylenia w stosunku do osi komórki.

W ostatnich latach szczególnie intensywnie bada się mikrotubule tzw. kortalne, zlokalizowane w przyściennym pokładzie cytoplazmy, mające wpływ na ułożenie mikrofibryli celulozowych w ścianie komórkowej, a tym samym na kierunki wzrostu komórki [10], [21]. Ich orientacja ulega ciekawym zmianom zarówno pod wpływem czynników wewnętrznych, jak i zewnętrznych (gravitacja, światło, hormony, naprężenia mechaniczne, pole elektryczne). Aby te zmiany ocenić, zazwyczaj mierzy się kąt nachylenia mikrotubul w stosunku do osi komórki.

Na polskim rynku jest znakomita monografia [10], w której wszechstronnie i wnikliwie przedstawiono budowę oraz podstawowe własności różnego typu mikrotubul. Brakuje natomiast publikacji, w których korzystając z narzędzi analizy i przetwarzania obrazów, można by wyznaczyć automatycznie kąty nachylenia poszczególnych mikrotubul, czy też ich orientację. Zagadnienie to jest szczególnie istotne, ponieważ biolodzy otrzymują dziesiątki, a nawet setki mikroskopowych obrazów mikrotubul i chcieliby przeprowadzić badania statystyczne rozkładu kątów nachylenia. Niestety, ręczna metoda jest bardzo pracochłonna i wrażliwa na doświadczenie badacza oraz bardzo rzadko powtarzalna. Analizy statystyczne w tym przypadku pozwalają co prawda na otrzymywanie jednoznacznych wyników, jednak niejednokrotnie niezbędna jest analiza zmian kąta nachylenia mikrotubul.

Na rys. 2.2 pokazano fragment pojedynczej komórki z widocznymi mikrotubulami. Mikrotubule na tych obrazach są to cienkie jasne linie o różnych kształtach i różnych wzajemnych położeniach, w których wyraźnie widoczne są globalne tendencje nachylenia.

Niestety, jak się okaże dalej, analiza tego typu obrazów, na których widoczna jest nierównomierność oświetlenia oraz liczne artefakty, nie należy do łatwych.



Rys. 2.2. Fragment pojedynczej komórki z widocznymi mikrotubulami

## 2.2. Algorytmy analizy obiektów wydłużonych

Znane z literatury metody, przeznaczone do analizy obiektów wydłużonych, można podzielić na dwie klasy:

- metody pośrednie, czyli takie, w których kąt nachylenia obiektów wydłużonych jest pozyskiwany jako proces wtórny na podstawie innych informacji, np. analizy konturu czy szkieletu obiektu;
- metody bezpośrednie, czyli takie, w których metodyka przyjęta w algorytmie pozwala na bezpośrednie pozyskanie kąta nachylenia.

Do metod pośrednich należą:

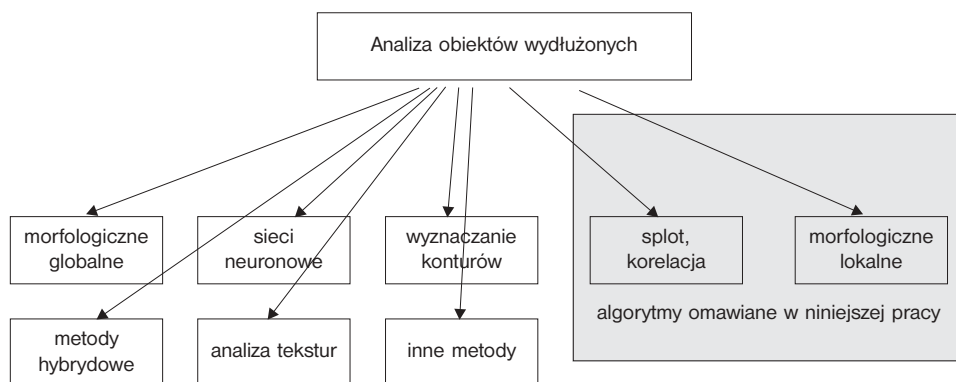
- metody morfologiczne w ujęciu globalnym [35],
- metody wykorzystujące sieci neuronowe [42],
- metody opierające się na wyznaczaniu konturów, np. wykorzystujące transformatę Hougha [7], [12], [15] i lokalne gradienty [23], [34],
- metody analizy tekstur [27],
- metody analizy falek [19] czy *beamlets* [4], [5], [6],
- metody hybrydowe powstałe z połączenia wspomnianych wcześniej metod [43], [51], [53],
- inne metody [31], [38], [41], [55], [57].

Do metod bezpośrednich należą:

- metody morfologiczne w ujęciu lokalnym [16], [17],
- metody oparte na splocie (korelacji wzajemnej) [39].

Na rysunku 2.3 zestawiono metody analizy obiektów wydłużonych z podziałem na metody pośrednie i metody bezpośrednie.

Na szczególną uwagę zasługują metody splotu, korelacji oraz metody przekształceń morfologicznych, które będą wykorzystywane w niniejszej pracy. Opisywane algorytmy stanowią modyfikacje znanych z licznych (wspomnianych wcześniej) pozycji literatury algorytmów. Modyfikacje te dotyczą profilowania dostępnych metod do analizy kąta i zmian kąta nachylenia mikrotubul jako obiektów wydłużonych.



Rys. 2.3. Podział metod analizy obiektów wydłużonych

Wymienione metody dają zadowalające rezultaty w wybranych, ściśle określonych zastosowaniach [4], [7], [28], [30], [49], [50].

Ważnym elementem analizy obrazów jest proces segmentacji. W segmentacji obiektów wydłużonych zazwyczaj korzysta się z algorytmów opartych na wykrywaniu krawędzi [2], [38], [41], a następnie na transformacie Hougha (TH) [12], [53]. Wadą metody segmentacji opartej na transformacie Hougha jest konieczność ustalania stałych wartości sigmy oraz progów dla detekcji krawędzi metodą Canny'ego [2]. W pracy [43] pokazano bowiem możliwość zastąpienia transformaty Hougha metodą przybliżania prostych, wykorzystującą zmodyfikowaną postać zależności najmniejszych kwadratów. Modyfikacje TH do detekcji linii za pomocą *beamlets* przedstawiono w pracach [4], [51], natomiast detekcję za pomocą *random line* omówiono w pracach [3], [6]. Metodę analizy gradientów występujących w detekcji obiektów zanalizowano w opracowaniu [32], a metodę *log-Hough transform* przedstawiono w publikacjach [33] i [36]. Stosunkowo ciekawa metoda detekcji linii wykorzystująca lokalne rozkłady pikseli została zaprezentowana w pozycjach [22] oraz [24]. Pomimo że algorytmów

z użyciem TH jest stosunkowo dużo, to analiza obiektów wydłużonych została przedstawiona w nielicznych publikacjach, między innymi w pracach [36] i [37]. Inną grupę metod związaną z segmentacją tekstur obiektów biologicznych i medycznych pokazano przykładowo w opracowaniu [33].

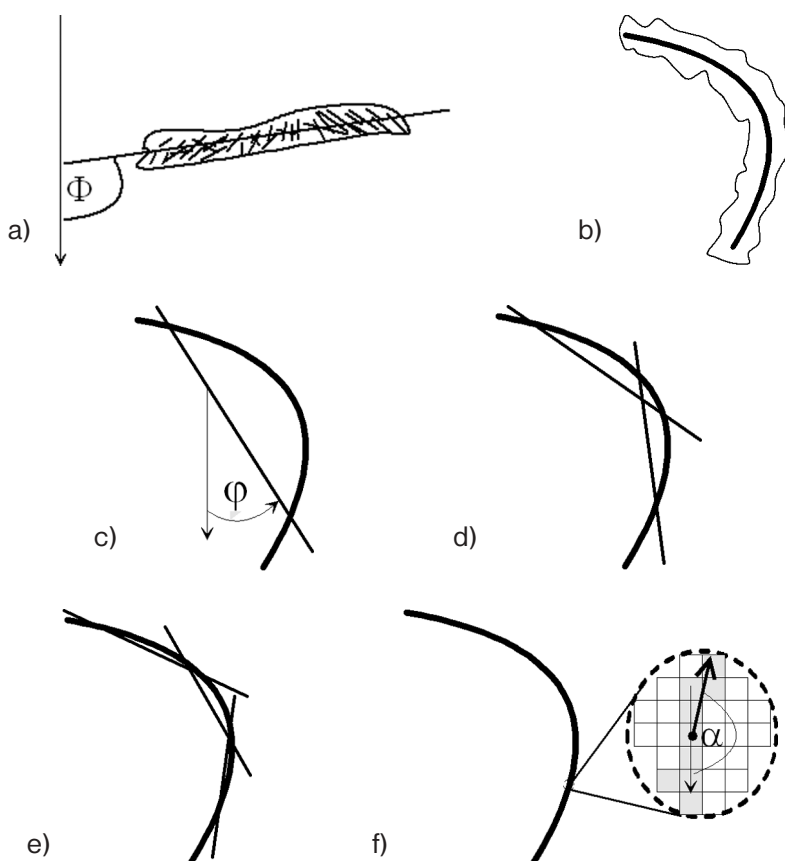
### 3. ALGORYTMY DO POMIARU KĄTA NACHYLENIA MIKROTUBUL

#### 3.1. Mikrotubule i ich geometryczne przybliżenie

Na rys. 3.1 zaprezentowano graficzną (schematyczną) ilustrację mikrotubul z rys. 2.2. Schematyczne rozmieszczenie mikrotubul w pojedynczej komórce pokazano na rys. 3.1 a. Kąt  $\Phi$  jest to kąt charakteryzujący nachylenie głównej osi komórki na obrazie mikroskopowym. Na rys. 3.1 b z kolei pokazano graficznie dwie charakterystyczne mikrotubule oraz schematyczne linie, które odzwierciedlają ich kształt. Chcąc określić zgodnie z celem pracy kąty nachylenia poszczególnych mikrotubul, na rys. 3.1 c, d, i e przedstawiono możliwe sposoby przybliżenia mikrotubul liniami prostymi. I tak, na rys. 3.1 c podano najprostszy sposób przybliżenia mikrotubuli jedną linią prostą. Ten sposób przybliżenia mikrotubuli dalej będziemy nazywać przybliżeniem 1-globalnym. Na rys. 3.1 d, e pokazano mikrotubule, które są przybliżone odpowiednio dwiema i trzema liniami. Ten sposób przybliżenia mikrotubuli będziemy nazywać odpowiednio przybliżeniem 2-globalnym i przybliżeniem 3-globalnym. W ogólnym przypadku, jeśli do przybliżenia mikrotubuli wykorzystamy  $k$  linii prostych, ten rodzaj aproksymacji mikrotubul będziemy nazywać przybliżeniem  $k$ -globalnym. Jak łatwo zauważyć, wzrost liczby  $k$  powoduje, że mikrotubule są coraz dokładniej przybliżane. Jeśli liczba aproksymujących linii  $k$  jest  $k \gg 1$ , to każda taka linia staje się styczną do mikrotubuli w danym punkcie — w danym pikselu mikrotubuli. Te styczne charakteryzują lokalne nachylenie, dalej nazywane lokalnym przybliżeniem. Zbiór tych stycznych tworzy pole kierunku, zwane również polem nachylenia, charakteryzujące dany piksel mikrotubuli, co pokazano na rys. 3.1 f. Oczywiście, nachylenie stycznej (pola kierunku) dla danego piksela jest funkcją tego piksela i jego otoczenia (zależność kontekstowa). Jak wynika z przedstawionych rozważań, każdy piksel mikrotubuli można scharakteryzować nie tylko współzrzednymi jego położenia  $(m, n)$ , lecz także kątem  $\alpha$  pola nachylenia.

W niniejszej pracy wprowadza się trzy pojęcia związane z graficznym przybliżeniem mikrotubul. Są to:

- *l*-globalne przybliżenie mikrotubuli lub *l*-globalne pole kierunku mikrotubuli; jest to przybliżenie mikrotubuli jedną linią prostą, tak jak pokazano to na rys. 3.1 c,
- *k*-globalne przybliżenie mikrotubuli lub *k*-globalne pole kierunku mikrotubuli; jest to przybliżenie mikrotubuli *k* liniami prostymi, jak pokazano na rys. 3.1 d dla  $k = 2$  liniom oraz na rys. 3.1 e dla  $k = 3$  liniom,
- lokalne przybliżenie mikrotubuli lub lokalne pole kierunku mikrotubuli, przez które należy rozumieć przybliżenie mikrotubuli w otoczeniu danego piksela — rys. 3.1 f.

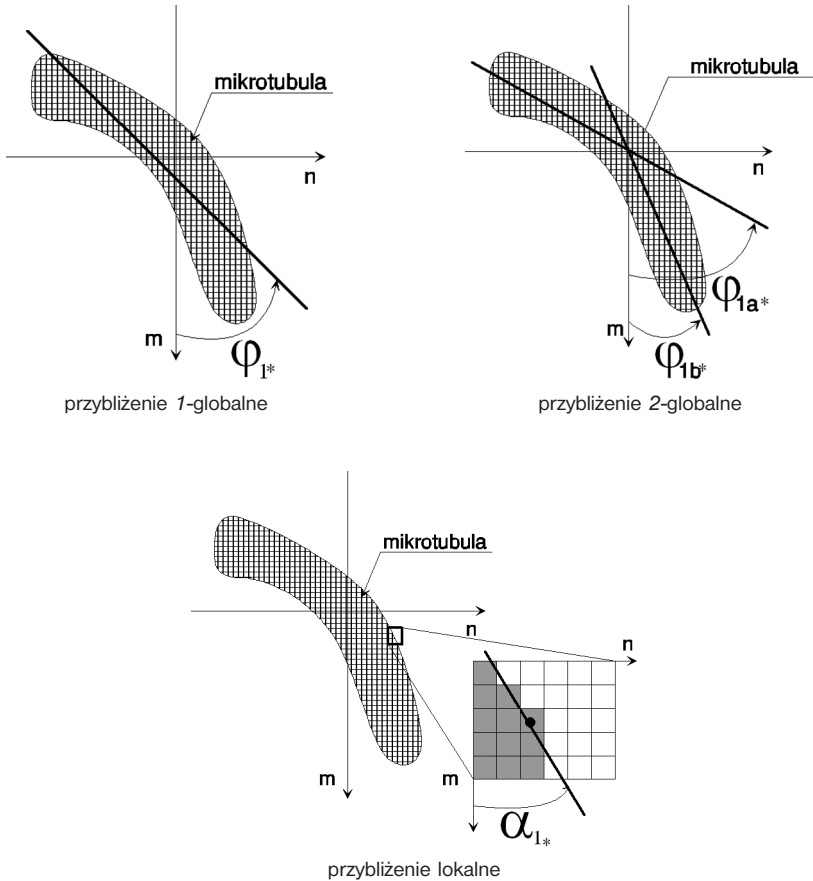


Rys. 3.1. Graficzna ilustracja kolejnych etapów opisu mikrotubul za pomocą pola kierunku (nachylenia)

a) graficzna ilustracja ułożenia mikrotubul w komórce, gdzie:  $\Phi$  jest kątem nachylenia linii aproksymującej daną komórkę, b) graficzna ilustracja pojedynczej mikrotubuli oraz jej przybliżenie linią odzwierciedlającą kształt mikrotubuli, c) przybliżenie mikrotubuli jedną linią prostą, d) przybliżenie mikrotubuli dwoma liniami prostymi, e) przybliżenie mikrotubuli trzema liniami prostymi, f) lokalne przybliżenie mikrotubuli, lokalne pole nachylenia

Pola kierunku: 1-globalne, 2-globalne i lokalne są kolejnymi stopniami przybliżenia mikrotubul. W zależności zatem od szczegółowości podejścia będziemy rozważać 1-globalne lub 2-globalne pole nachylenia, charakteryzujące mikrotubule jako całość (rys. 3.1 c i rys. 3.1 d) w obrazie lub o lokalnym polu nachylenia charakteryzującym kształt pojedynczej mikrotubuli, co ilustruje rys. 3.1 f.

Na rys. 3.1 pokazano graficzną ilustrację kolejnych etapów przybliżenia mikrotubul. Rysunek 3.2 natomiast przedstawia przestrzenne modele mikrotubul, które ilustrują kolejne przybliżenia wykorzystywane do pomiaru kąta nachylenia.



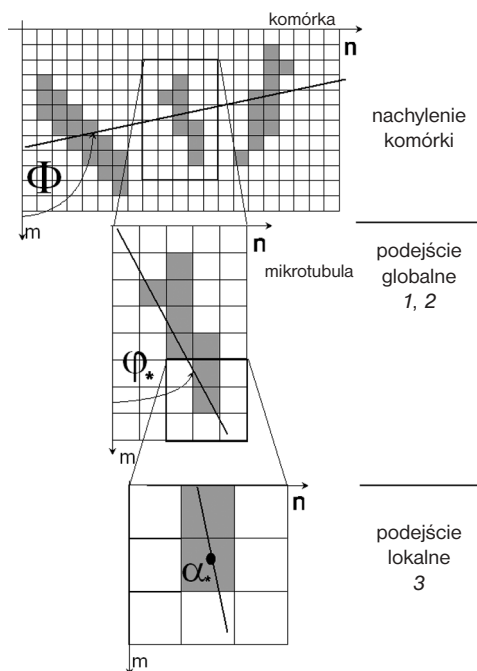
Rys. 3.2. Ilustracja kątów charakteryzujących nachylenie mikrotubul

W celu wykrycia kąta nachylenia komórki prezentowane podejście zostanie rozszerzone jako globalna analiza obrazu. W podrozdziale 3.4 jest przedstawiona analiza globalna związana z pomiarem stopnia nachylenia komórek względem macierzy obrazu oraz analiza uzyskanych histogramów nachylenia mikro-



tubul. Ze względu na konieczność wyróżnienia poszczególnych podejść, jak też metodykę wyznaczania kątów przyjęto następujące oznaczenia kątów:

- $\alpha$  — kąt nachylenia mikrotubuli w podejściu lokalnym (kąt nachylenia stycznej w danym punkcie mikrotubuli — rys. 3.1 i rys. 3.2),
- $\varphi$  — kąt nachylenia mikrotubuli w podejściu globalnym (kąt nachylenia prostej przybliżającej kąt nachylenia całej mikrotubuli — rys. 3.1),
- $\theta$  — kąt orientacji maski (rys. 3.1).

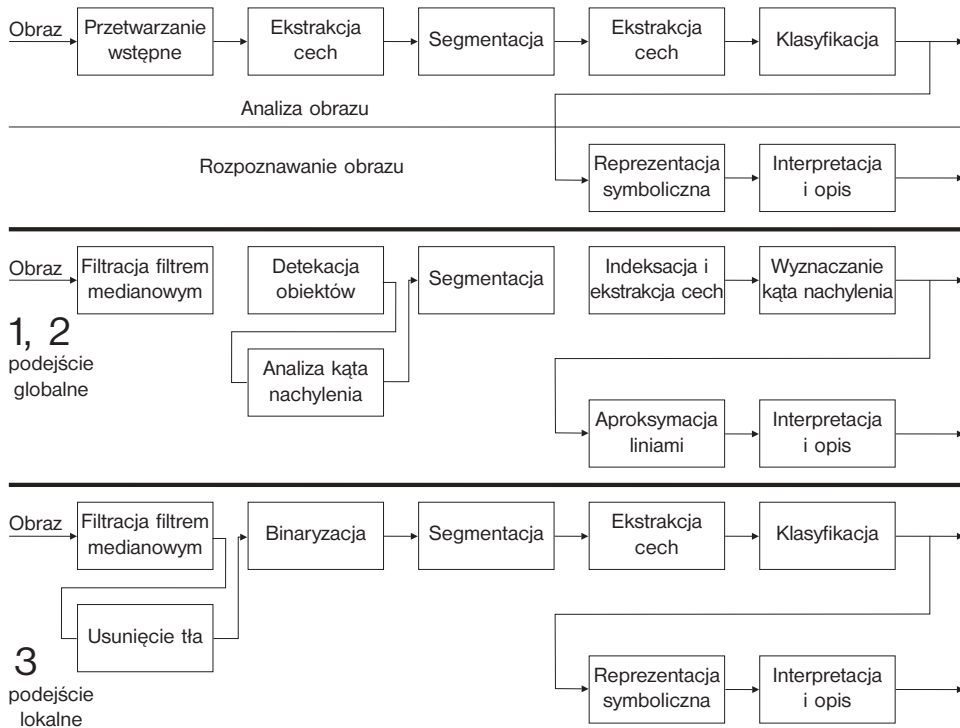


Rys. 3.3. Schemat poglądowy podziału metod pomiaru kąta nachylenia mikrotubul na 1-, 2-globalne i 3-lokalne oraz kąta nachylenia komórki

Na schemacie pokazanym na rys. 3.3, a także w dalszych rozdziałach wartości kąta najlepiej spełniające dane kryterium oznaczano konsekwentnie „\*”.

Schemat blokowy ogólnego algorytmu pozwalającego wykonać wstępną analizę i rozpoznawanie mikrotubul na obrazie uzyskanym z mikroskopu przedstawiono na rys. 3.4.

Znane metody przetwarzania obrazów pozwalają na dość wszechstronną interpretację poszczególnych bloków algorytmu (rys. 3.4). Z tego powodu, a także na potrzeby późniejszej optymalizacji, wstępnie przedstawiono ideę oraz metodykę pomiaru stopnia nachylenia mikrotubul (podrozdział 3.3), w kolejnych zaś podrozdziałach rozszerzono opisywane podejście na dwa docelowe algorytmy.



Rys. 3.4. Schemat blokowy wstępnej analizy i rozpoznawania mikrotubul

### 3.2. Wstępne przetwarzanie obrazu

Szerokość mikrotubuli jest rzędu kilku nanometrów [10], co w typowym powiększeniu mikroskopu 4000 razy oraz przy typowej rozdzielczości obrazu  $2048 \times 1536$  średnio daje 10 pikseli/nm.

Wstępne przetwarzanie obrazu  $L_{\text{RGB}}$  dotyczące wszystkich trzech podejść (rys. 3.4) jest związane z zastosowaniem filtru medianowego z kwadratową maską  $h$  o rozdzielczości  $M_h \times N_h = 7 \times 7$ , dzięki czemu usunięte zostają drobne szumy, pozostawiając treść mikrotubul. Dobór rozmiaru maski przyjęto arbitralnie na podstawie analizy jakości filtracji innymi typami filtrów, a także dla innych rozmiarów masek filtru medianowego kilkunastu obrazów, biorąc pod uwagę jednocześnie powiększenie mikroskopu i rozmiary mikrotubul.

Drugim etapem wstępnego przetwarzania obrazu jest konwersja z obrazu kolorowego  $L_{\text{RGB}}$  do obrazu w poziomach szarości  $L_{\text{GRAY}}$ , np. z wykorzystaniem następującej zależności [39]:

$$\begin{aligned}
 \begin{bmatrix} L_{\text{GRAY}}(m, n) = L_{\text{HSV}}(m, n, 1) \\ L_{\text{HSV}}(m, n, 2) \\ L_{\text{HSV}}(m, n, 3) \end{bmatrix} &= \\
 &= \begin{bmatrix} 0,299 & 0,587 & 0,114 \\ 0,596 & -0,274 & -0,322 \\ 0,211 & -0,523 & 0,312 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} L_{\text{RGB}}(m, n, 1) \\ L_{\text{RGB}}(m, n, 2) \\ L_{\text{RGB}}(m, n, 3) \end{bmatrix},
 \end{aligned} \tag{3.1}$$

zatem:

$$\begin{aligned}
 L_{\text{GRAY}}(m, n) &= \\
 &= 0,2989 \cdot L_{\text{RGB}}(m, n, 1) + 0,587 \cdot L_{\text{RGB}}(m, n, 2) + 0,114 \cdot L_{\text{RGB}}(m, n, 3),
 \end{aligned} \tag{3.2}$$

gdzie:

- $L_{\text{GRAY}}(m, n)$  — obraz monochromatyczny,
- $L_{\text{RGB}}(m, n)$  — obraz kolorowy RGB,
- $L_{\text{RGB}}(m, n, 1)$  — składowa R obrazu kolorowego RGB,
- $L_{\text{RGB}}(m, n, 2)$  — składowa G obrazu kolorowego RGB,
- $L_{\text{RGB}}(m, n, 3)$  — składowa B obrazu kolorowego RGB,
- $L_{\text{HSV}}(m, n)$  — obraz kolorowy HSV.

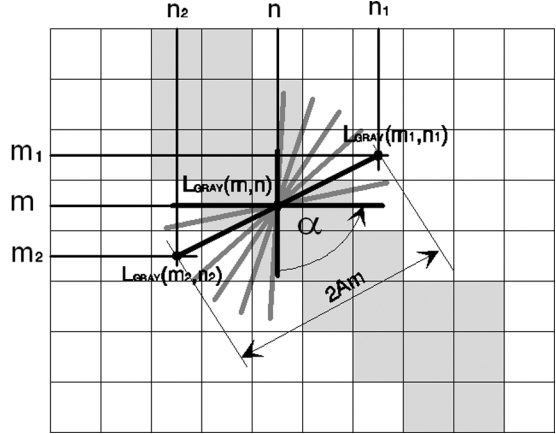
Monochromatyczny obraz  $L_{\text{GRAY}}(m, n)$  został zatem utworzony w wyniku eliminacji barwy i nasycenia, z zachowaniem luminancji (metod konwersji obrazu  $L_{\text{RGB}}(m, n)$  do  $L_{\text{GRAY}}(m, n)$ ). Powstały w ten sposób obraz  $L_{\text{GRAY}}(m, n)$  stanowi podstawę opisywanych kolejno algorytmów.

### 3.3. Idea oraz algorytm pomiaru stopnia nachylenia mikrotubul

Pierwsze intuicyjne podejście do analizy kąta nachylenia mikrotubul opiera się na pomiarze kąta nachylenia mikrotubul, a następnie analizowaniu lokalnie ich fragmentów (obszarów obrazu). Do tego typu analizy należy utworzyć obraz binarny wydzielonych obiektów, mikrotubul od tła oraz zastosować podejście globalne do analizy sekwencji lokalnych kątów nachylenia dla pojedynczej mikrotubuli.

Na podstawie analizy obrazu  $L_{\text{GRAY}}(m, n)$  oraz wymienionych przesłanek biologicznych dotyczących rozmiarów mikrotubul przyjęto hipotezę, że mikrotubule charakteryzuje ciągłość, możliwość krzyżowania się z innymi mikrotubulami oraz stosunkowo duży kontrast z tłem, zwłaszcza na krawędziach. Cechy te wykorzystano do detekcji mikrotubul, analizując krawędzie oraz ich położenie względem osi symetrii (rys. 3.5).

Rys. 3.5. Schemat poglądowy działania algorytmu



Analiza w przyjętym algorytmie, na podstawie wspomnianych przesłanek, dotyczy wyznaczania w stosunku do punktu  $L_{\text{GRAY}}(m, n)$  (rys. 3.5) punktów  $L_{\text{GRAY}}(m_1, n_1)$  i  $L_{\text{GRAY}}(m_2, n_2)$  dla kolejnych kątów  $\alpha$  takich, których suma wartości będzie znacznie odbiegała od wartości (poziomu nasycenia) piksela  $L_{\text{GRAY}}(m, n)$ . Wartość kąta  $\alpha$ , dla którego zostanie najlepiej spełniona powyższa zależność  $\alpha_*$ , będzie zapamiętywana jako wartość piksela obrazu wyjściowego  $L_{\alpha_*}(m, n)$ . Poziomy nasycenia  $L_{\text{GRAY}}(m_1, n_1)$  i  $L_{\text{GRAY}}(m_2, n_2)$  są funkcją aktualnie analizowanego piksela  $L_{\text{GRAY}}(m, n)$  dla danego kąta  $\alpha$ , w związku z czym czasem zamiennie stosuje się zapis  $L_{\text{GRAY}}(m_1(m, \alpha), n_1(m, \alpha))$  i  $L_{\text{GRAY}}(m_2(m, \alpha), n_2(m, \alpha))$  (w stosunku do  $L_{\text{GRAY}}(m_1, n_1)$  i  $L_{\text{GRAY}}(m_2, n_2)$ ). Odległość między wierszami i kolumnami  $m_1, m_2$  oraz  $n_1, n_2$  zależy od wartości amplitudy  $A_m$  (rys. 3.5) oraz od kąta  $\alpha$ , tj.:

$$\begin{bmatrix} m_1(m, \alpha) & m_2(m, \alpha) \\ n_1(n, \alpha) & n_2(n, \alpha) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} m \\ n \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} 1 & 1 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \sin(\alpha) \\ \cos(\alpha) \end{bmatrix} \cdot [A_m - A_m]. \quad (3.3)$$

Na podstawie par współrzędnych  $m_1, m_2$  oraz  $n_1, n_2$  dla kątów  $\alpha$  z przedziału  $0-180^\circ$  obliczono sumę,  $L_{\text{SGRAY}}(m_1, m_2, n_1, n_2)$ , w postaci:

$$\begin{aligned} L_{\text{SGRAY}}(m_{1,2}(m, \alpha), n_{1,2}(n, \alpha)) &= \\ &= L_{\text{GRAY}}(m_1(m, \alpha), n_1(n, \alpha)) + L_{\text{GRAY}}(m_2(m, \alpha), n_2(n, \alpha)). \end{aligned} \quad (3.4)$$

Istotne z punktu widzenia zaproponowanego algorytmu są te pary pikseli dla zadanego kąta  $\alpha$ , których suma jest minimalna. Oznacza to, że są to piksele tworzące tło ułożone prostopadłe do osi głównej mikrotubuli. Kąt ten, dla którego wyliczono minimum różnicy  $L_{\text{SGRAY}}(m_{1,2}(m, \alpha_*), n_{1,2}(n, \alpha_*))$ , oznaczono dalej jako  $\alpha_*$ , zatem:

$$\begin{aligned}
L_{\text{SGRAY}}(m_{1,2}(m, \alpha_*), n_{1,2}(m, \alpha_*)) &= \\
&= \min_{\alpha \in [0, 180)} (L_{\text{SGRAY}}(m_{1,2}(m, \alpha), n_{1,2}(n, \alpha))) \quad (3.5)
\end{aligned}$$

Ostatnim istotnym elementem jest przyjęcie progu  $p_r$  takiego, dla którego piksele spełniające zależność:

$$L_{\alpha_*}(m, n) = \begin{cases} \alpha_* & \text{dla } \begin{cases} (L_{\text{GRAY}}(m, n) - L_{\text{GRAY}}(m_1(m, \alpha_*), n_1(n, \alpha_*))) \geq p_r \wedge \\ (L_{\text{GRAY}}(m, n) - L_{\text{GRAY}}(m_2(m, \alpha_*), n_2(n, \alpha_*))) \geq p_r \end{cases} \\ 0 & \text{dla pozostałych} \end{cases} \quad (3.6)$$

Piksele spełniające równanie (3.6) będą uznawane za tworzące mikrotubule. Próg ten ustalano arbitralnie na poziomie 0,1—0,9, określa on bowiem poziom odcięcia analizowanych wartości kątowych. W praktyce okazało się, że opisane kryteria nie są wystarczające, w związku z czym dodano konieczność współlistnienia minimalnego (poniżej ustalonego progu) gradientu w analizowanym punkcie o współrzędnych  $(m, n)$ , tj.:

$$L_{\alpha_*}(m, n) = \begin{cases} \alpha_* & \text{dla } \begin{cases} (L_{\text{GRAY}}(m, n) - L_{\text{GRAY}}(m_1(m, \alpha_*), n_1(n, \alpha_*))) \geq p_r \wedge \\ (L_{\text{GRAY}}(m, n) - L_{\text{GRAY}}(m_2(m, \alpha_*), n_2(n, \alpha_*))) \geq p_r \wedge \\ L_{\text{GBIN}}(m, n) = 1 \end{cases} \\ 0 & \text{dla pozostałych } (m, n) \end{cases} \quad (3.7)$$

W zależności (3.7)  $L_{\text{GBIN}}(m, n)$  jest obrazem binarnym zawierającym wartości równe 1 przy spełnionym warunku minimum gradientu oraz równe 0 w przeciwnym przypadku.

Obraz  $L_{\text{GBIN}}(m, n)$  wyliczono, korzystając z zależności opartej na jądrze przekształcenia Gaussa [29], [39], tj.:

$$G(u_1(m_h, n_h, \theta), \sigma_1) = \frac{1}{\sigma_1 \cdot \sqrt{2 \cdot \pi}} \cdot \exp \left\{ -\frac{u_1(m_h, n_h, \theta)^2}{2 \cdot \sigma_1} \right\}, \quad (3.8)$$

$$\begin{aligned}
G'(u_2(m_h, n_h, \theta), \sigma_2) &= \frac{u_2(m_h, n_h, \theta)}{\sigma_2^2} \cdot G(u_2(m_h, n_h, \theta), \sigma_2) = \\
&= \frac{u_2(m_h, n_h, \theta)}{\sigma_2^3 \cdot \sqrt{2 \cdot \pi}} \cdot \exp \left\{ -\frac{u_2(m_h, n_h, \theta)^2}{2 \cdot \sigma_2^2} \right\}, \quad (3.9)
\end{aligned}$$

gdzie:

$$\begin{bmatrix} u_1(m_h, n_h, \theta) \\ u_2(m_h, n_h, \theta) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \cos(\theta) & -\sin(\theta) \\ \sin(\theta) & \cos(\theta) \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} m_h \\ n_h \end{bmatrix}, \quad (3.10)$$

gdzie:

- $m_h, n_h$  — są położeniem pikseli w masce  $h$  filtru Gaussa o rozmiarze  $M_h \times N_h$ ; rozdzielczość maski  $h$ ,
- $\theta$  — kąt orientacji maski  $h$ ,
- $\sigma$  — odchylenie standardowe średniej.

Na tej podstawie obliczono wartości w masce  $h$ , używanej dalej do filtracji obrazu, zgodnie z wyrażeniem:

$$h(m_h, n_h, \theta, \sigma_1, \sigma_2) = G(u_1(m_h, n_h, \theta), \sigma_1) \cdot G(u_2(m_h, n_h, \theta), \sigma_2). \quad (3.11)$$

Po normalizacji otrzymujemy:

$$h_N(m_h, n_h, \theta, \sigma_1, \sigma_2) = \frac{h(m_h, n_h, \theta, \sigma_1, \sigma_2)}{\sqrt{\sum_{n_h=-N_h/2}^{N_h/2} \sum_{m_h=-M_h/2}^{M_h/2} h(m_h, n_h, \theta, \sigma_1, \sigma_2)^2}}. \quad (3.12)$$

Na przykład dla  $M_h \times N_h = 3 \times 3$  oraz  $\theta = 0^\circ$  i  $\theta = 90^\circ$ :

$$h_x = \begin{bmatrix} 0.325 & 0 & -0.325 \\ 0.536 & 0 & -0.536 \\ 0.325 & 0 & -0.325 \end{bmatrix}$$

Rys. 3.6. Maska  $h_x$  filtru dla osi  $ox$

$$h_y = \begin{bmatrix} 0.325 & 0.536 & 0.325 \\ 0 & 0 & 0 \\ -0.325 & -0.536 & -0.325 \end{bmatrix}$$

Rys. 3.7. Maska  $h_y$  filtru dla osi  $oy$

Obrazy  $L_{GX}(m, n)$  i  $L_{GY}(m, n)$  zatem, będące wynikiem splotu z maskami  $h_x$  i  $h_y$  z uprzywilejowującymi kierunki odpowiednio:  $\theta = 0^\circ$  oraz  $\theta = 90^\circ$ , dla przyjętej wartości odchylenia standardowego  $\sigma = \sigma_1 = \sigma_2 = 1$ , wynoszą:

$$L_{GX}(m, n) = \sum_{n_h=-B/2}^{N_h/2} \sum_{m_h=-M_h/2}^{M_h/2} L_{GRAY}(m + m_h, n + n_h) \cdot h_x(m_h, n_h, 90, \sigma_1, \sigma_2), \quad (3.13)$$

$$L_{GY}(m, n) = \sum_{n_h=-B/2}^{N_h/2} \sum_{m_h=-M_h/2}^{M_h/2} L_{GRAY}(m + m_h, n + n_h) \cdot h_y(m_h, n_h, 0, \sigma_1, \sigma_2). \quad (3.14)$$

Macierz gradientu  $L_{GXY}(m, n)$  w obu kierunkach wyznaczono zgodnie z zależnością:

$$L_{GXY}(m, n) = \sqrt{L_{GX}(m, n)^2 + L_{GY}(m, n)^2}. \quad (3.15)$$

A więc przyjmując próg  $p_{xy}$ :

$$p_{xy} = \varepsilon \cdot \left( \max_{m, n \in L_{GXY}} (L_{GXY}(m, n)) - \min_{m, n \in L_{GXY}} (L_{GXY}(m, n)) \right) + \min_{m, n \in L_{GX}} (L_{GX}(m, n)), \quad (3.16)$$

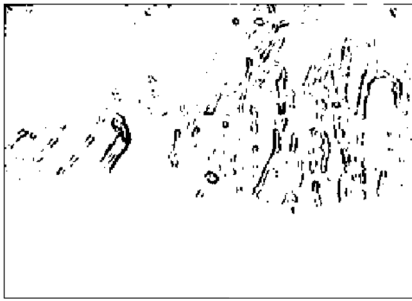
dla  $\varepsilon$  zmienianego w zakresie:

$$\varepsilon \in (0, 1), \quad (3.17)$$

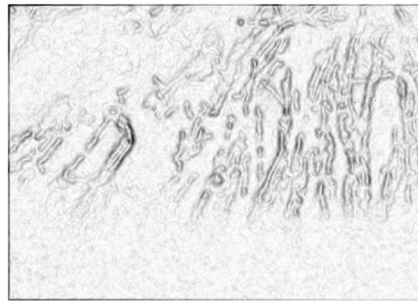
otrzymujemy  $L_{GBIN}(m, n)$ , który jest ostatnim składnikiem warunku (3.7), czyli

$$L_{GBIN}(m, n) = \begin{cases} 0 & \text{dla } L_{GXY}(m, n) \geq p_{xy}, \\ 1 & \text{dla } L_{GXY}(m, n) < p_{xy}. \end{cases} \quad (3.18)$$

Powstałe obrazy  $L_{GBIN}$  oraz  $L_{GXY}$  zilustrowano na rys. 3.8 i 3.9.



Rys. 3.8. Obraz  $L_{GIN}(m, n)$ ,  $\varepsilon = 0,3$

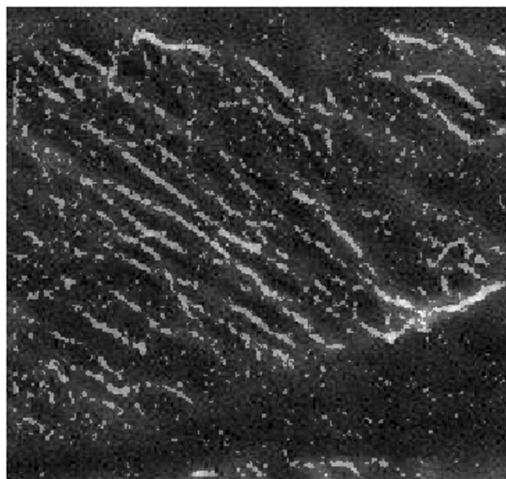


Rys. 3.9. Obraz  $1 - L_{GXY}(m, n)$

Zależność (3.7) można zapisać też dla wyjściowego obrazu binarnego:

$$L_{BIN}(m, n) = \begin{cases} 1 & \text{dla } \left( L_{GRAY}(m, n) - L_{GRAY}(m_1(m, \alpha_*), n_1(n, \alpha_*)) \right) \geq p_r \wedge \\ & \left( L_{GRAY}(m, n) - L_{GRAY}(m_2(m, \alpha_*), n_2(n, \alpha_*)) \right) \geq p_r \wedge \\ & L_{GBIN}(m, n) = 1 \\ 0 & \text{dla pozostałych } (m, n) \end{cases} \quad (3.19)$$

Otrzymane rezultaty, czyli obraz  $L_{\text{BIN}}$  oraz  $L_{\alpha_*}$ , pokazano na rys. 3.10, a wycinek  $L_{\alpha_*}$  (162 : 170, 160 : 168) obrazu  $L_{\alpha_*}$  przedstawiono na rys. 3.11.



Rys. 3.10. Suma obrazów:  $L_{\text{GRAY}}(m, n)$  oraz  $L_{\text{BIN}}(m, n)$  odpowiednio w proporcjach 70% i 30%

Niestety, wynikowy obraz, którego fragment przedstawiono na rys. 3.11, wymaga dalszej obróbki ujednolicającej wartości kątowe zapisane dla każdego z pikseli w obrębie jednej mikrotubuli.

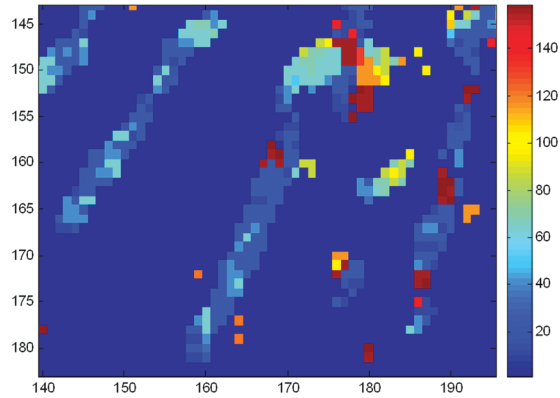
55	58	255	255	255	255	255	255	255
56	55	57	255	255	255	255	255	255
58	56	56	54	255	255	255	255	255
255	56	55	52	50	50	255	255	255
255	255	54	53	46	50	51	255	255
255	255	255	54	48	46	46	50	255
255	255	255	255	255	255	46	46	50
255	255	255	255	255	255	255	46	46
255	255	255	255	255	255	255	50	46

Rys. 3.11. Obraz  $L_{\alpha_*}$  (162 : 170, 160 : 168)

Wartości pikseli podano w skali kątowej



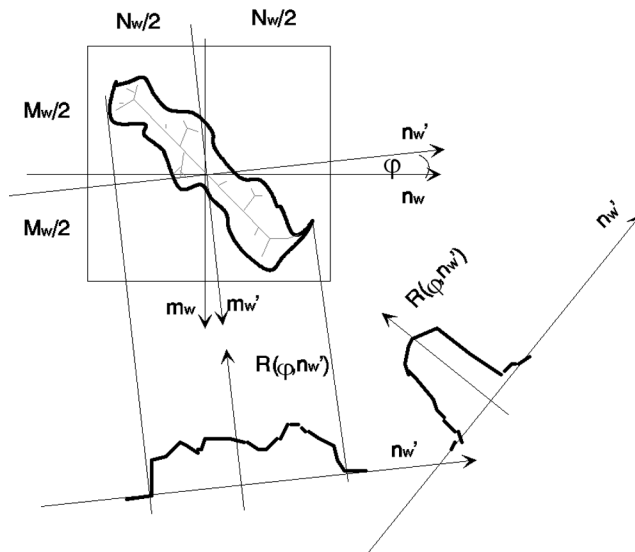
Rozmieszczenie oraz przyjmowane wartości w obrazie  $L_{\alpha_*}(m, n)$  nasuwają wiele możliwości ukierunkowania dalszej obróbki, co ilustruje rys. 3.12.



Rys. 3.12. Obraz  $L_{\alpha_*}$  (162 : 170, 160 : 168)

Wartości pikseli podano w skali kątowej w sztucznej paletce barw

Jedną z nich jest globalna analiza w założonym z góry oknie obszaru oraz przyjęcie miary kątowej nachylenia będącej wynikiem transformaty Radona.



Rys. 3.13. Schemat poglądowy metody pomiaru kątów oraz rozmieszczenia układów współrzędnych

Stosowana dalej transformata Radona opiera się na transformacji układu współrzędnych  $(m, n)$  w  $(m', n')$ , widocznych na rys. 3.13.

Analizę przeprowadzono dla kolejnych fragmentów obrazu  $L_{\text{SBIN}}(m, n)$  (obraz  $L_{\text{BIN}}$ ). Pod uwagę wzięto kolejne fragmenty o rozdzielczości  $M_w \times N_w$  co piksel dla każdego z wierszy  $m$  i każdej kolumny  $n$ , zgodnie z zależnością (3.18), tj.:

$$L_{\text{SBINW}}(m, n) = L_{\text{SBIN}}\left(\left(m - \frac{M_w}{2}\right) : \left(m + \frac{M_w}{2}\right), \left(n - \frac{N_w}{2}\right) : \left(n + \frac{N_w}{2}\right)\right). \quad (3.20)$$

$M_w$  i  $N_w$  są to rozdzielczości wycinka, którego środek pokrywa się ze środkiem układu współrzędnych w punkcie  $(m, n)$ .

$$\begin{bmatrix} n_w' \\ m_w' \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \cos(\varphi) & \sin(\varphi) \\ -\sin(\varphi) & \cos(\varphi) \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} n_w \\ m_w \end{bmatrix}. \quad (3.21)$$

Poszukiwany kąt nachylenia wycinka obrazu  $L_{\text{SBINW}}$  dla  $M_w = N_w$  obliczono z zależności:

$$R(\varphi_*, n_w') = \max_{n_w' \in [-1/\sqrt{2} \cdot N_w, 1/\sqrt{2} \cdot N_w]} (R(\varphi, n_w')), \quad (3.22)$$

gdzie:

$$\begin{aligned} R(\varphi, n_w') &= \\ &= \sum_{m_w' = 1/\sqrt{2} \cdot M_w}^{1/\sqrt{2} \cdot M_w} L_{\text{SBINW}}(m_w' \cdot \sin(\varphi) + n_w' \cdot \cos(\varphi), m_w' \cdot \cos(\varphi) - n_w' \cdot \sin(\varphi)). \end{aligned} \quad (3.23)$$

Zmodyfikowana wartość kąta nachylenia zatem wynosi:

$$L_{\varphi_*}(m, n) = \begin{cases} \varphi_*(m, n) & \text{dla } L_{\text{SBIN}} = 1, \\ 255 & \text{dla } L_{\text{SBIN}} \neq 1. \end{cases} \quad (3.24)$$

Wartość 255 dla wycinków obrazu  $L_{\text{SBIN}}$  nie spełniających warunku (3.24) wynika z konieczności odróżnienia pikseli z wartościami kąta w przedziale 0—180° spełniających warunek.



Rys. 3.14. Obraz  $L_{\varphi_*}(m, n)$  (162 : 170, 160 : 168)  
Wartości pikseli podano w skali kątowej w sztucznej palecie barw

Obraz wynikowy  $L_{\varphi_*}(m, n)$  przedstawiono na rys. 3.14, a wybrany powiększony fragment pokazano na rys. 3.15.

156,0	0,0	255,0	255,0	255,0	0,0	0,0	255,0
0,0	0,0	255,0	255,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,0	255,0	255,0	255,0	0,0	167,0	167,0	0,0
255,0	255,0	255,0	255,0	0,0	167,0	167,0	0,0
255,0	255,0	255,0	0,0	0,0	167,0	167,0	0,0
255,0	255,0	0,0	0,0	0,0	167,0	167,0	0,0
255,0	255,0	0,0	167,0	167,0	167,0	0,0	0,0
255,0	255,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	255,0

Rys. 3.15. Obraz  $L_{\alpha_*}(m, n)$  (162 : 170, 160 : 168)

Wartości pikseli podano w odpowiednich komórkach

Analiza poszczególnych obiektów umożliwiła obliczenie wartości mediany kąta określającego obiekt. Z uwagi na ten fakt może dojść do podziału obiektów na mniejsze, jeśli zawierają wartości kątów znacznie różniące się od siebie, np.:

$$\begin{aligned}
 L_{\alpha_* W}(m, n, m_W, n_W) &= \\
 &= L_{\alpha_*} \left( \left( m - \frac{M_W}{2} \right) : \left( m + \frac{M_W}{2} \right), \left( n - \frac{N_W}{2} \right) : \left( n + \frac{N_W}{2} \right) \right), \quad (3.25)
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 L_{G\alpha_*}(m, n) &= \max_{m_w, n_w \in L_{\alpha_* W}} \left( L_{\alpha_* W}(m, n, m_w, n_w) \right) - \\
 &\quad - \min_{m_w, n_w \in L_{\alpha_* W}} \left( L_{\alpha_* W}(m, n, m_w, n_w) \right). \quad (3.26)
 \end{aligned}$$

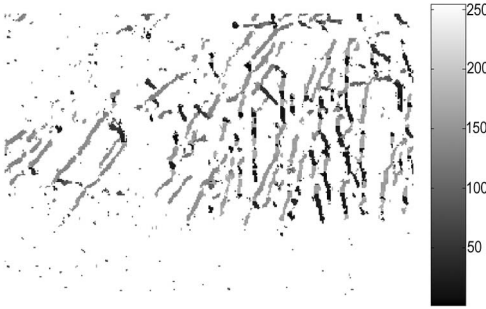
Wówczas:

$$L_{\alpha_{**}}(m, n) = \begin{cases} \text{med.} \left( L_{\alpha_W}(m, n, m_W, n_W) \right), & \text{gdy } L_{G_{\alpha_*}}(m, n, m_W, n_W) \leq p_{\text{tr}}, \\ m_W, n_W \in L_{\alpha_W}, & \text{gdy } L_{G_{\alpha_*}}(m, n, m_W, n_W) > p_{\text{tr}}, \end{cases} \quad (3.27)$$

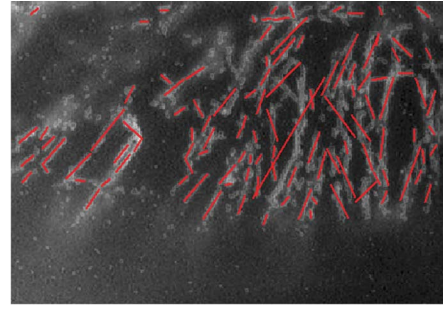
gdzie:

med. — mediana.

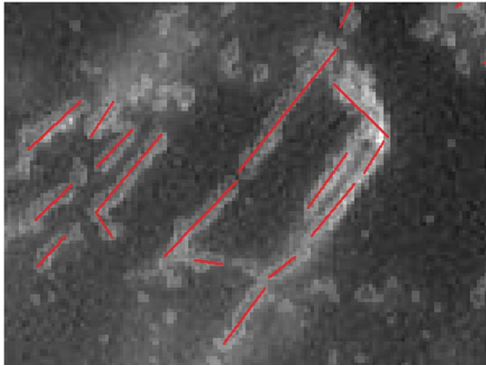
Jeśli zatem wartość różnicy w kącie  $\alpha_*$  jest niższa niż z góry ustalony próg  $p_{\text{tr}}$  w wycinku obrazu  $L_{\alpha_W}(m, n)$ , to piksel obrazu  $L_{\alpha_{**}}(m, n)$  przyjmuje wartość mediany analizowanego wycinka. Wyjściowy obraz  $L_{\alpha_{**}}(m, n)$  oraz uzyskany histogram ilustruje rys. 3.16, 3.17, 3.18 i 3.19.



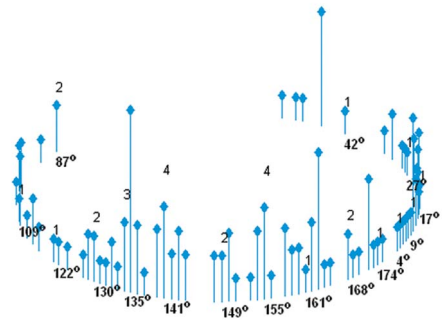
Rys. 3.16. Obraz  $L_{\alpha_{**}}$  z paletą barw obrazującą wartości katowe



Rys. 3.17. Obraz wejściowy  $L_{\text{GRAY}}$  z naniesionymi prostymi przybliżającymi położenie mikrotubul



Rys. 3.18. Fragment obrazu z rys. 3.17



Rys. 3.19. Histogram kołowy stopni nachylenia mikrotubul

Uzyskiwane z zależności (3.27) kąty  $\alpha_{**}$  dla kolejnych pikseli obrazu zostały przybliżone linią prostą, z wykorzystaniem transformaty Radona, opisywanej wcześniej ((3.21), (3.22) i (3.23)).

Kąt nachylenia mikrotubul dalej będzie oznaczany jako  $\varphi_*(k)$  dla  $k$  mikrotubul. Mając na uwadze „ciągłość” histogramu kąta nachylenia mikrotubul (przejście między  $0^\circ$  a  $180^\circ$ ), wykreślono histogram w sposób przedstawiony na rys. 3.19. W praktyce stosuje się względny rozkład częstości określany jako odsetek całkowitej liczby pomiarów (mikrotubul) należący do danej kategorii (danego kąta nachylenia).

### 3.4. Optymalizacja algorytmu

Jeśli w praktyce zachodzi konieczność optymalizacji zarówno czasu pracy samego algorytmu, jak i minimalizacji stopnia skomplikowania, niezbędne jest wyeliminowanie i opuszczenie wybranych fragmentów algorytmu prezentowanego wcześniej.

Skrócenie czasu pracy bywa zazwyczaj obarczone zmniejszeniem dokładności. Jednak w tym przypadku zwrócono też uwagę na minimalizację ilości implementowanych zależności.

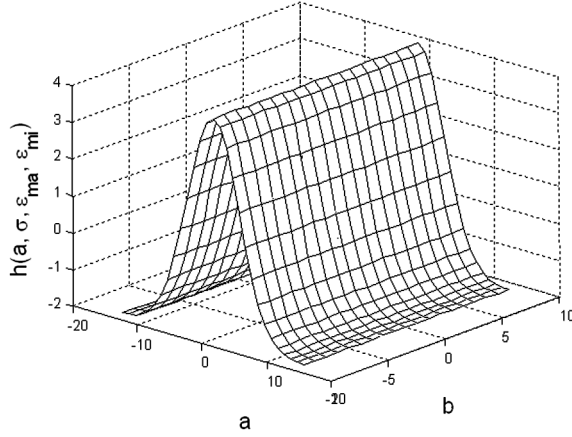
Początek uproszczonego algorytmu swoją funkcjonalnością jest zbliżony do klasycznego, opisywanego w poprzednim podrozdziale. Po filtracji filtrem medianowym o rozmiarze  $9 \times 9$  następuje proces iteracyjny pozwalający obliczyć splot dla kątów  $\theta$  z przedziału  $0$ — $179^\circ$ , wykorzystujący maskę splotu o rozdzielczości  $M_h \times N_h$ :

$$h(m_h, \sigma, \varepsilon_{ma}, \varepsilon_{mi}, \theta=0) = \underbrace{\begin{bmatrix} 1 \\ 1 \\ \dots \\ 1 \end{bmatrix}}_B * (\varepsilon_{ma} - \varepsilon_{mi}) + \varepsilon_{mi} \cdot \exp\left\{-\frac{m_h^2}{2 \cdot \sigma^2}\right\}, \quad (3.28)$$

gdzie:

$\varepsilon_{mi}, \varepsilon_{ma}$  — wartości maksymalne i minimalne maski  $h$ .

Dla  $\varepsilon_{mi} = -2$  i  $\varepsilon_{ma} = 4$ ,  $\sigma = 1$  oraz  $\theta = 0^\circ$  otrzymano następujące wartości w masce, przedstawione na rys. 3.20, dla rozdzielczości  $29 \times 19$ .



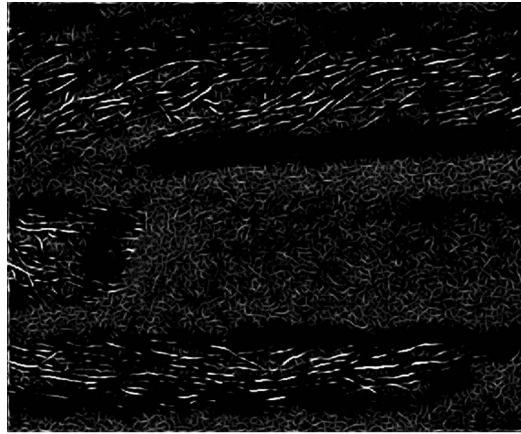
Rys. 3.20. Maska  $h$  otrzymana dla  $\varepsilon_{mi} = -2$  i  $\varepsilon_{ma} = 4$ ,  $\sigma = 1$  oraz  $\theta = 0^\circ$

Kolejnym etapem działania algorytmu było wykonywanie sekwencyjnie splotu z maską  $h$  dla kątów  $\theta$  z przedziału  $0—179^\circ$  co  $1^\circ$ .

$$L_{\text{GRAY}_h}(m, n, \theta) = \sum_{m_h=-M_h/2}^{M_h/2} \sum_{n_h=-N_h/2}^{N_h/2} L_{\text{GRAY}}(m + m_h, n + n_h) \cdot h_y(m_h, \sigma, \varepsilon_{ma}, \varepsilon_{mi}, \theta), \quad (3.29)$$

$$L_{ma}(m, n) = \max_{\theta \in (0, 179)} (L_{\text{GRAY}_h}(m, n, \theta)). \quad (3.30)$$

Wynikowy obraz  $L_{ma}(m, n)$  pokazano na rys. 3.21.

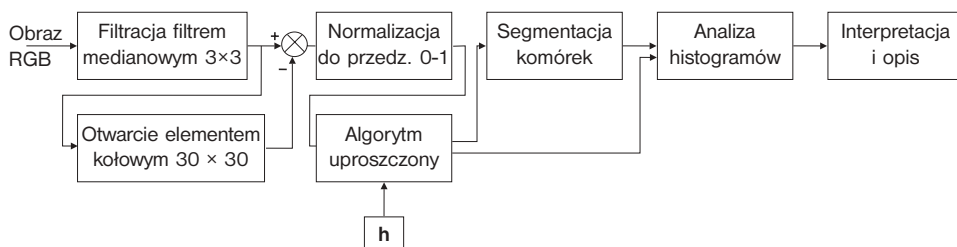


Rys. 3.21. Obraz  $L_{ma}(m, n)$

Kolejne etapy działania algorytmu są identyczne z podejściem klasycznym (zależności (3.25)–(3.27)). Obraz  $L_{a_s}$  jest obrazem o rozdzielności obrazu  $L_{ma}$  z wartościami kąta  $\theta$ , dla którego osiągnięto maksimum (zależność (3.30)).

Zarówno dokładność, jak i wrażliwość algorytmu w podejściu klasycznym i uproszczonym są zbliżone, jednak w przypadku tego drugiego osiąga się znaczne (ok. 40%) zmniejszenie czasu obliczeń. Czas obliczeń może ulec zmianie zależnie od środowiska, w którym będzie implementowany algorytm. Implementacja opisanego powyżej uproszczonego algorytmu przebiega zgodnie z przedstawionym dalej algorytmem.

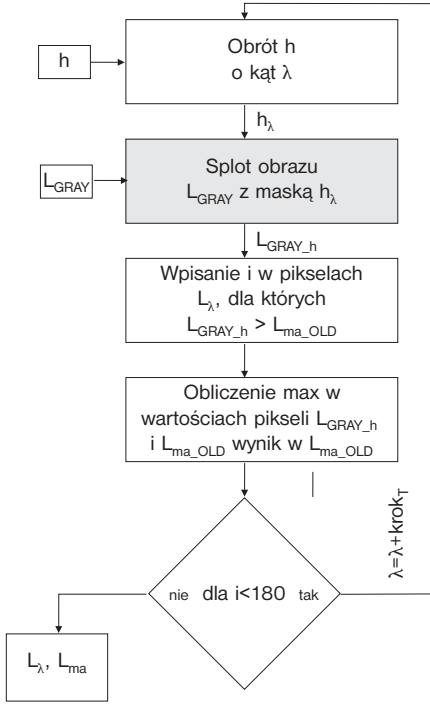
Prezentowany zmodyfikowany algorytm zawiera się w jednym bloku „algorytm uproszczony” schematu przedstawionego na rys. 3.22. Jest to zmodyfikowany schemat blokowy algorytmu z rys. 3.4.



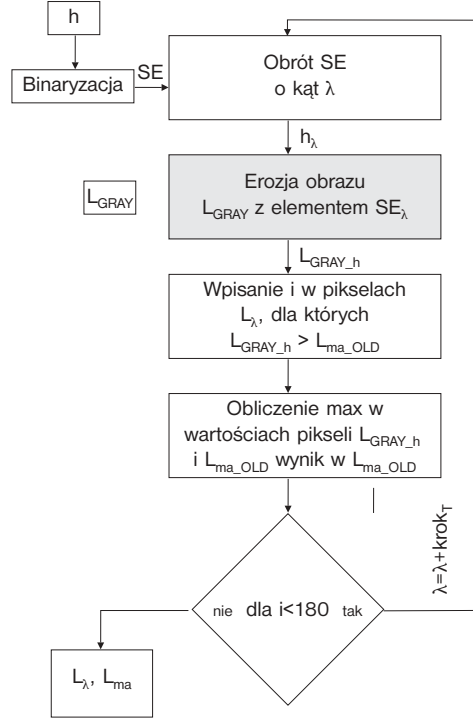
Rys. 3.22. Schemat blokowy uproszczonego algorytmu pomiaru kąta orientacji mikrotubul z uwzględnieniem kąta nachylenia komórek

Implementacja analizowanego uproszczonego algorytmu praktycznie nie nastręcza trudności. Jednakże konieczność optymalizacji czasowej nasuwa możliwość modyfikacji zaprezentowanego algorytmu o wykorzystanie erozji obrazu w miejsce realizowanego splotu.

W uproszczeniu działanie algorytmów  $a_s$  (algorytm wykorzystujący splot) i  $a_e$  (algorytm wykorzystujący erozję) przebiega zgodnie z przedstawionym tu schematem blokowym algorytmu (rys. 3.23 —  $a_s$  i rys. 3.24 —  $a_e$ ).



Rys. 3.23. Schemat blokowy uproszczonego algorytmu as pomiaru kąta orientacji obiektów wydłużonych



Rys. 3.24. Schemat blokowy uproszczonego algorytmu ae pomiaru kąta orientacji obiektów wydłużonych

Na wprowadzonym obrazie po filtracji filtrem medianowym o rozmiarze  $9 \times 9$ , w przypadku algorytmu as następuje proces iteracyjny obliczania splotu dla kątów  $\lambda$  z przedziału  $0\text{--}180^\circ$ , wykorzystujący maskę splotu o rozdzielczości  $M_h \times N_h$ :

$$\begin{aligned}
 h(m_h, n_h, \sigma_h, \varepsilon_{ma}, \varepsilon_{mi}) = & \\
 = & \underbrace{\begin{bmatrix} 1 \\ 1 \\ \dots \\ 1 \end{bmatrix}}_{N_h} * \left\{ (\varepsilon_{ma} - \varepsilon_{mi}) + \varepsilon_{mi} \cdot \exp \left\{ -\frac{(M_h / 2 - m_h)^2}{2 \cdot \sigma_h^2} \right\} \right\}, \quad (3.31)
 \end{aligned}$$

gdzie:

$\varepsilon_{ma}, \varepsilon_{mi}$  — wartości maksymalne i minimalne maski  $h$ ,  
 $\sigma_h$  — odchylenie standardowe średniej maski  $h$ .

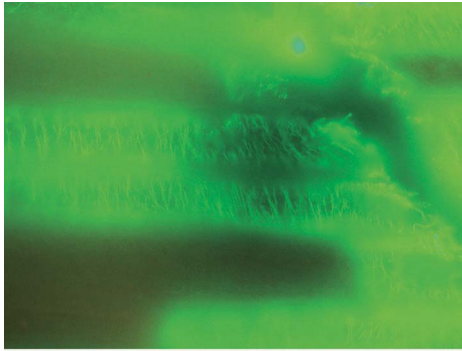


Kolejnym etapem działania algorytmu jest wykonywanie sekwencyjnie splotu z maską  $h_\lambda$  (powstałą w wyniku obrotu  $h$  o kąt  $\lambda$ ) dla kątów  $\lambda$  z przedziału  $0—180^\circ$ , co krok<sub>T</sub>, np. co  $1^\circ$ .

$$L_{\text{GRAY}_h}(m, n, \lambda) = \sum_{m_h=-M_h/2}^{M_h/2} \sum_{n_h=-N_h/2}^{N_h/2} L_{\text{GRAY}}(m + m_h, n + n_h) \cdot h_\lambda(m_h, n_h, \sigma_h, \varepsilon_{ma}, \varepsilon_{mi}), \quad (3.32)$$

$$L_{ma}(m, n) = \max_{\lambda \in (0, 180)} (L_{\text{GRAY}_h}(m, n, \lambda)). \quad (3.33)$$

Utworzony na tej podstawie obraz  $L_{ma}$  pokazano na rys. 3.27. Obraz  $L_\lambda$  ma rozdzielność obrazu  $L_{ma}$ , z wartościami kąta  $\lambda$ , dla którego osiągnięto maksimum (zależność (3.30)). Uzyskane obrazy  $L_{\text{RGB}}$ ,  $L_\lambda$ ,  $L_{ma}$  oraz  $L_{\text{GRAY}}$  pokazano na rys. 3.25—3.28.

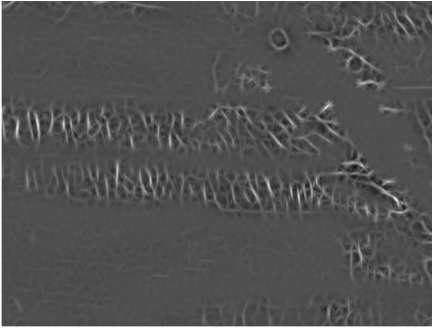
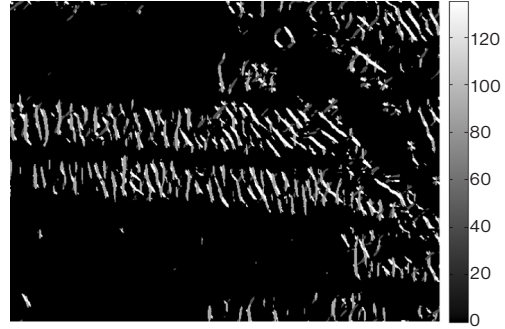


Rys. 3.25. Obraz wejściowy  $L_{\text{RGB}}$



Rys. 3.26. Obraz  $L_\lambda$

W przypadku algorytmu ae zarówno proces iteracyjny, jak i zależność na obliczanie maksimum (3.33) pozostają bez zmian. Modyfikacji ulega natomiast spłot, w którego miejsce realizowana jest procedura obliczania erozji z elementem strukturalnym SE, powstałym w wyniku binaryzacji z dolnym progiem (równym „0”) maski  $h$  (obliczonej zgodnie z (3.31)) — rys. 3.20.

Rys. 3.27. Obraz  $L_{ma}$ Rys. 3.28. Obraz będący wynikiem zależności:  
 $(L_{ma} > 20) \cdot L_{\lambda}$ 

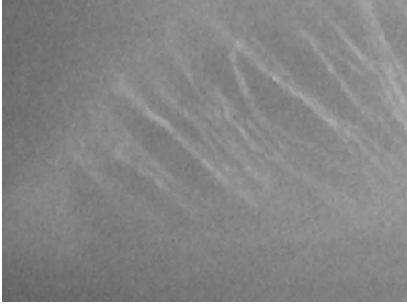
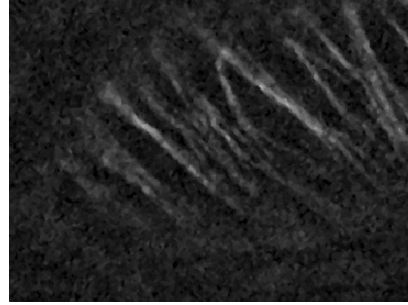
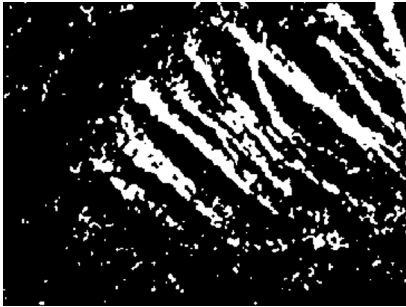
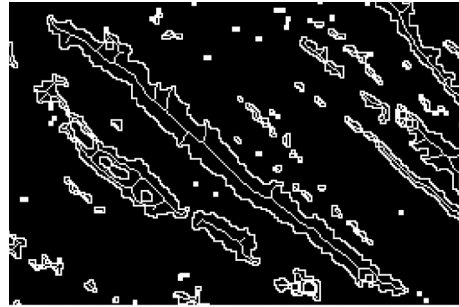
Weryfikacja jakości otrzymanych rezultatów oraz wrażliwość algorytmów na zmiany wartości parametrów będą analizowane w kolejnych podrozdziałach, wcześniej jednak należy wspomnieć o niemal intuicyjnie nasuwającym się algorytmie, opierającym się na szkieletyzacji.

### 3.5. Zastosowanie operacji szkieletyzacji dla mikrotubul

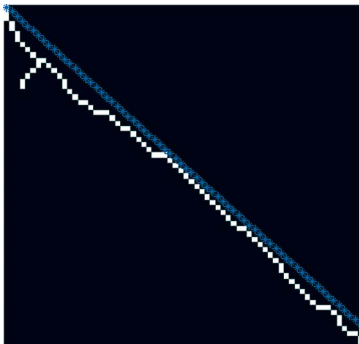
Jedną z najprostszych metod, które intuicyjnie odpowiadają stawianemu zagadnieniu, jest przybliżenie mikrotubuli linią prostą — podejście  $l$ -globalne (rys. 3.2). W tym celu wykorzystuje się transformatę Hougha (Radona) dla linii prostych, również w analizie obrazu (której wyniki opisano dalej) po operacji szkieletyzacji. Budowa omawianego typu algorytmu jest intuicyjna i w tym miejscu nie będzie szczegółowo opisywana. Przebiega w kolejności prezentowania kolejnych obrazów:

- rys. 3.29 — obraz wejściowy  $L_{\text{GRAY}}(m, n)$ ,
- rys. 3.30 — obraz po normalizacji obrazu  $L_{\text{GRAY}}(m, n)$ ; normalizacja została zrealizowana do pełnego przedziału poziomów szarości,
- rys. 3.31 — obraz binarny  $L_{\text{BIN}}(m, n)$  powstały w wyniku binaryzacji z dolnym progiem obrazu  $L_{\text{GRAY2}}(m, n)$ ,
- rys. 3.32 — suma logiczna obrazu konturu (kontur  $L_{\text{BIN}}(m, n)$ ) oraz obrazu po szkieletyzacji ( $L_{\text{BIN}}(m, n)$ ).

Przedstawione wyniki mają na celu jedynie zapoznanie Czytelnika z jednym z możliwych rozwiązań intuicyjnie (według autorów) pasującym do tego typu zagadnienia.

Rys. 3.29. Obraz  $L_{\text{GRAY}}(m, n)$ Rys. 3.30. Obraz  $L_{\text{GRAY2}}(m, n)$ Rys. 3.31. Obraz  $L_{\text{BIN}}(m, n)$ Rys. 3.32. Fragment obrazu  $L_{\text{SKEL}}(m, n)$  konturu oraz szkieletyzacji obrazu  $L_{\text{BIN}}(m, n)$ 

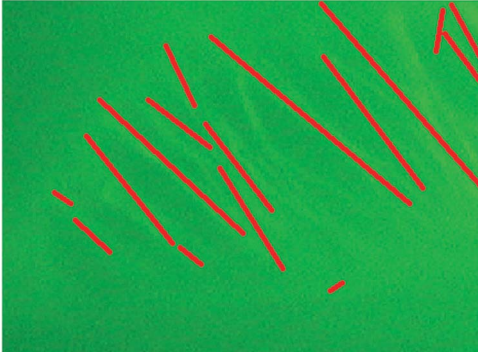
Jedno z podstawowych zastosowań transformaty Hougha jest związane z wykrywaniem linii występujących na obrazie szkielecie  $L_{\text{SKEL}}$  (rys. 3.32).

Rys. 3.33. Przykładowy fragment obrazu  $L_{\text{SKEL}}(m, n)$ Rys. 3.34. Obraz  $L_{\text{RGB}}(m, n)$  z uwzględnionymi wyznaczonymi mikrotubulami

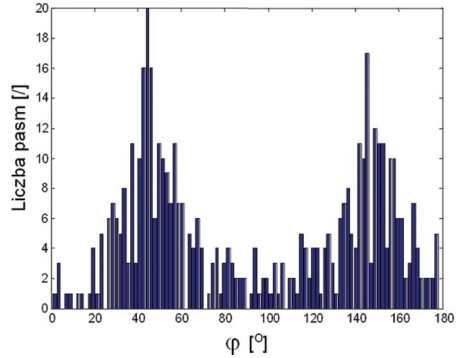
Wykrycie linii prostej sprowadza się — jak pokazano w podrozdziale wcześniej — do wyznaczenia maksimum na obrazie powstałym z wyznaczenia pary parametrów  $(m, \varphi)$ .

Dla rozdzielczości powstałego obrazu  $M \times N$  wartości  $\varphi$  ustalono z przedziału  $0\text{--}180^\circ$ . Na rys. 3.33 przedstawiono przykładowy szkielet.

Uogólniając poglądowy algorytm szkieletyzacji na cały obraz, uzyskano następujące rezultaty (rys. 3.34, 3.35):



Rys. 3.35. Powiększony fragment obrazu  $L_{\text{RGB}}(m, n)$  z uwzględnionymi wyznaczonymi mikrotubulami



Rys. 3.36. Histogram kąta nachylenia linii przybliżających pasmo z rys. 3.34 dla segmentowanych obiektów

Powstałe w ten sposób linie proste przybliżające rozkład pasm mają nachylenie względem osi  $\circ x$  (rys. 3.36).

Przedstawiona metoda jest jednak wrażliwa na rezultaty procesu binaryzacji (rys. 3.31), z tego powodu w dalszych rozważaniach będzie uwzględniana tylko fundamentalnie.

### 3.6. Analiza kąta nachylenia komórek

Analiza kąta nachylenia mikrotubul wymaga od operatora pomiaru stopnia ich nachylenia względem głównej osi komórki, co pokazano na rys. 3.1 a. W praktyce najczęściej proces ten odbywa się ręcznie lub z wykorzystaniem edytora graficznego jako pomocy podczas rysowania prostej przybliżającej położenie mikrotubuli. W poprzednich podrozdziałach opisano algorytmy umożliwiające w sposób w pełni automatyczny pomiar stopnia nachylenia wszystkich wydzielonych w procesie przetwarzania obrazów mikrotubul. Procedura pomiaru zarówno ręcznego, jak i w pełni automatycznego, pozwalająca na zwiększenie liczebności analizowanych mikrotubul, nie umożliwia w sposób globalny analizy zmian stopnia ich nachylenia. Z tego powodu celowe staje się stworzenie nowego algorytmu przetwarzania obrazów umożliwiającego pomiar

zmian stopnia ich nachylenia. Jedno z przykładowych rozwiązań tego typu zostało przedstawione w dalszej części rozdziału. Z założenia analiza zmiany stopnia nachylenia mikrotubul powinna przebiegać wzdłuż osi komórki.

Opisana metodyka postępowania oraz algorytm stanowią fundamentalny element automatycznego pomiaru stopnia nachylenia mikrotubul. W praktycznym zastosowaniu, podczas pozyskiwania obrazów z mikroskopu, otrzymuje się obraz komórek umieszczonych pod różnymi osiami w stosunku do układu współrzędnych obrazu, co ilustruje rys. 3.21. W takim przypadku niezbędne staje się zaproponowanie i zbudowanie algorytmu analizującego globalne nachylenie komórek w stosunku do osi obrazu.

Globalne podejście do problemu określenia stopnia nachylenia komórek sugeruje sposób związany z analizą tekstur, który zweryfikowano, przeprowadzając analizę dla obszarów o rozdzielczości  $M_t \times N_t = 5 \times 5$ . Wyniki dla tego typu analizy uzyskano z wykorzystaniem analogii do zależności (4.2), (4.3) oraz:

$$\text{hist}(i, m, n) = \sum_{m_t = -M_t/2}^{M_t/2} \sum_{n_t = -N_t/2}^{N_t/2} s(i, L_{\text{GRAY}}(m + m_t, n + n_t)). \quad (3.34)$$

Czynnik po prawej stronie równania (3.34) można wyznaczyć z zależności:

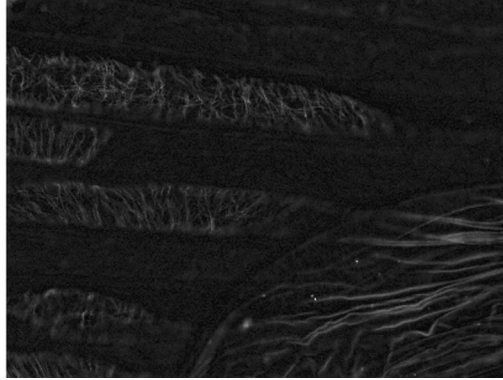
$$s(i, L_{\text{GRAY}}(m + m_t, n + n_t)) = \begin{cases} 1 & \text{dla } L_{\text{GRAY}}(m + m_t, n + n_t) = i, \\ 0 & \text{dla } L_{\text{GRAY}}(m + m_t, n + n_t) \neq i, \end{cases} \quad (3.35)$$

$$L_t(m, n) = \sum_{i=0}^{2^8-1} \text{hist}^2(i, m, n) \quad (3.36)$$

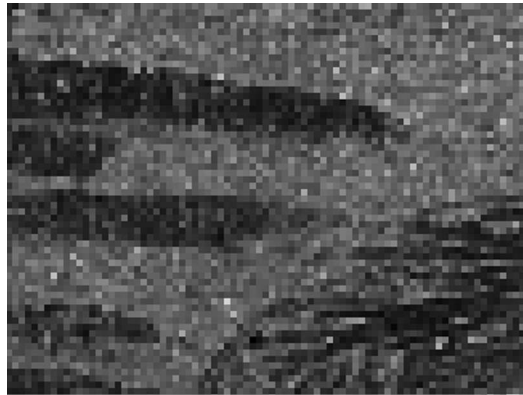
dla

$$m, n \in M \times N.$$

Na rys. 3.37 pokazano obraz wejściowy  $L_{\text{GRAY}}(m, n)$ , który został poddany obróbkce.

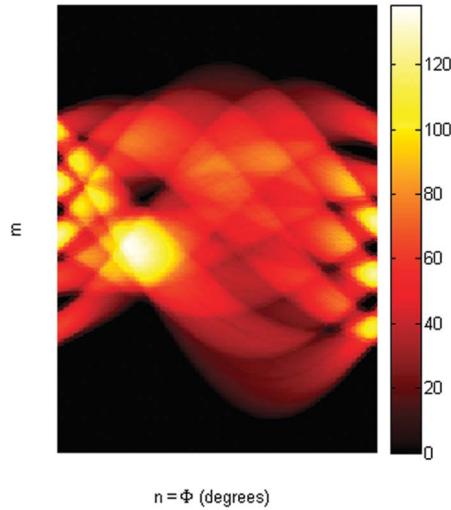
Rys. 3.37. Obraz wejściowy  $L_{\text{GRAY}}(m, n)$ 

Na rys. 3.38 przedstawiono obraz  $L_t(m, n)$ .

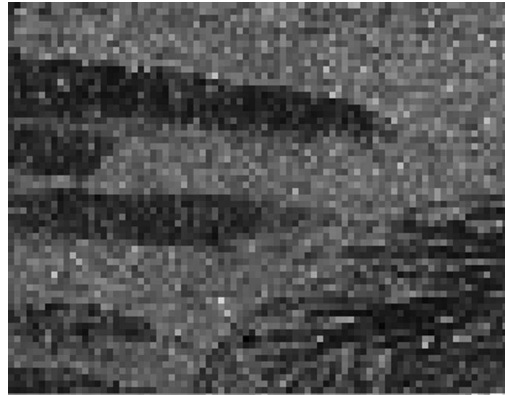
Rys. 3.38. Obraz  $L_t(m, n)$ 

Następnie na podstawie zależności dla transformaty Radona, zgodnie ze wzorem (3.22), otrzymano obraz  $L_R(m, n = \Phi)$  przedstawiony na rys. 3.39. Znak równości  $n = \Phi$  wynika z definicji transformaty Radona, w której poszczególne kolumny obrazu  $L_R$  zostały utworzone dla stałej wartości kąta  $\Phi$ .



Rys. 3.39. Obraz  $L_R(m, n)$ 

Obliczenie maksimum poziomu szarości obrazu  $L_R(m, n = \Phi)$  wskazuje na globalną orientację  $\Phi_*$  komórek (zależność (3.22)). Stopień nachylenia pokazano linią prostą na rys. 3.40.

Rys. 3.40. Obraz testowy z zaznaczonymi orientacjami komórek  $\Phi_{**} = 180^\circ$  i  $\Phi_{**} = 41^\circ$ 

Otrzymano nieprawidłową orientację komórek wynikającą z maksimum sumy uzyskanym dla kąta  $41^\circ$ . Prawidłowa orientacja komórek (rys. 3.40) to ok.  $180^\circ$ . Wartość taką uzyskano, modyfikując obraz  $L_R(m, n) = \Phi$  w następujący sposób:

$$L_{Gv}(m, n) = \frac{L_R(m + \Delta m, n) - L_R(m, n)}{\Delta m}, \quad (3.37)$$

$$G_s(n) = \sum_{m=1}^M |L_{Gv}(m, n)|, \quad (3.38)$$

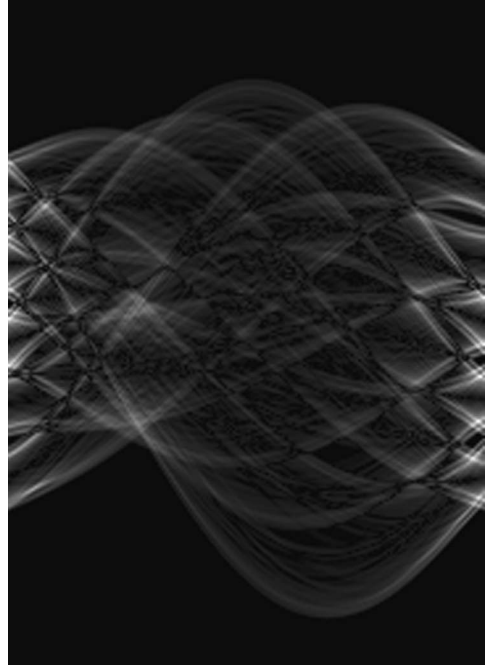
$$G_s(n_* = \Phi_{**}) = \max_{n \in (1, N_l)} (G_s(n)), \quad (3.39)$$

gdzie:

$L_{Gv}(m, n)$  — obraz różnicy pikseli w wierszach,

$G_s(n)$  — suma bezwzględnych wartości wierszy macierzy  $L_{Gv}$ .

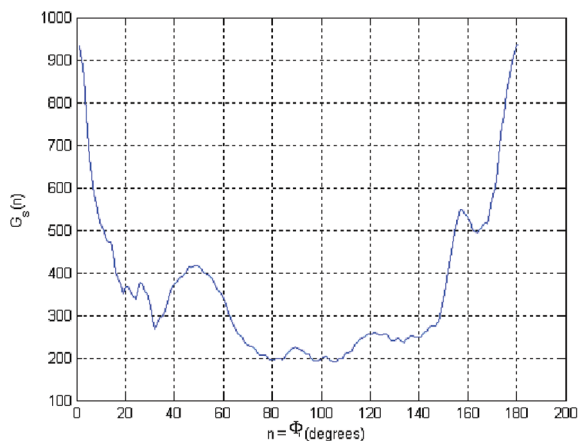
Na rysunku 3.41 przedstawiono obraz gradientu  $L_{Gv}(m, n = \Phi)$  w osi  $oy$  obrazu  $L_R(m, n = \Phi)$ .



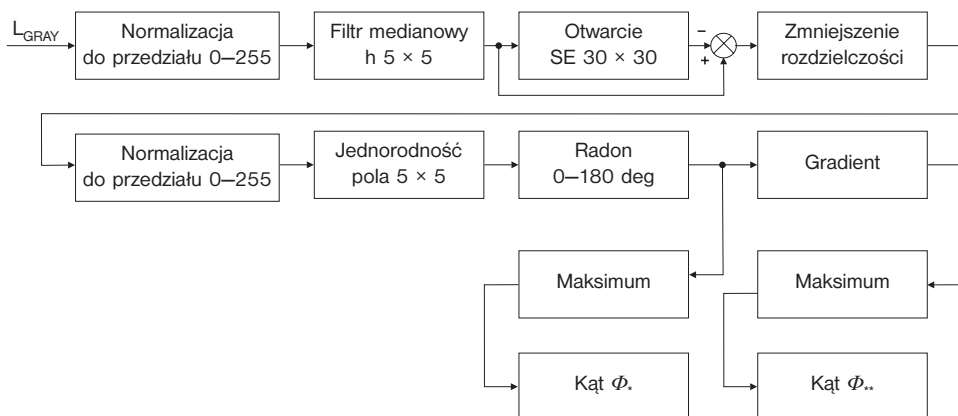
Rys. 3.41. Obraz  $L_{Gv}(m, n = \Phi)$

Z kolei przebieg zmian sumy wartości gradientu dla poszczególnych pikseli obrazu  $L_R$  pokazano na rys. 3.42. Zgodnie z zależnością (3.39) obliczono ostateczną wartość kąta nachylenia komórek dla obrazu z rys. 3.40, tj.  $\Phi_{**} = 180^\circ$ .



Rys. 3.42. Przebieg funkcji  $G_s(n)$ 

Ogólną postać algorytmu wyznaczania kąta nachylenia komórek zaprezentowano na rys. 3.43.



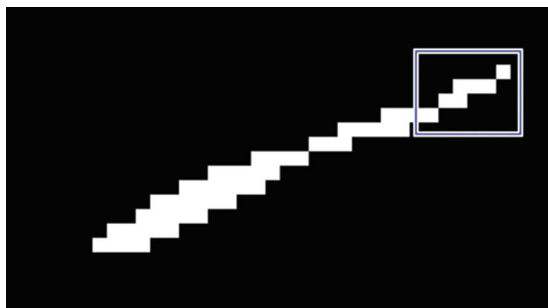
Rys. 3.43. Schemat blokowy algorytmu wyznaczania kąta nachylenia komórek

Algorytm służy do analizy kąta nachylenia komórek widocznych w polu obrazu, jeśli komórki są ułożone równolegle w stosunku do siebie.

## 4. WŁASNOŚCI OPRACOWANEGO ALGORYTMU

### 4.1. Przybliżenie mikrotubuli prostą

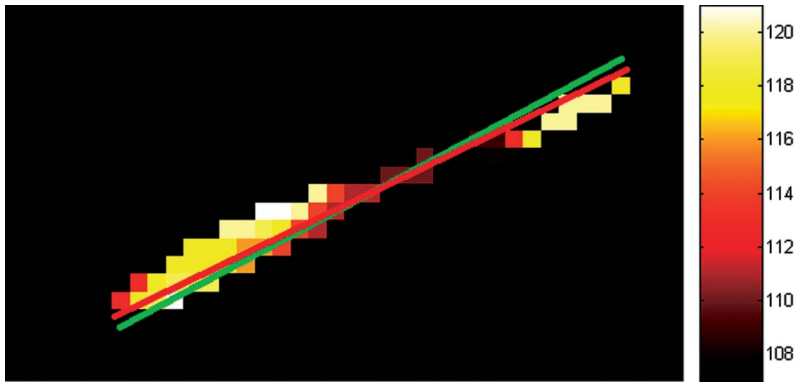
Przedstawiona metodyka postępowania dowodzi poprawności podejścia w osiągnięciu wspomnianego celu, jakim jest pomiar stopnia nachylenia mikrotubul w ujęciu globalnym (przybliżenie linią prostą nachylenia mikrotubuli). Pod tym pojęciem rozumiany będzie jeden pomiar związany z jedną mikrotubulą — jedna wartość kąta nachylenia. Podejście tego typu pozwala uzyskać znamienne statystycznie pomiary jedynie w przypadku dużej liczby mikrotubul, natomiast z punktu widzenia biologicznego istotna staje się jedna mikrotubula, gdyż globalna analiza kąta nachylenia może być obciążona dużym błędem, zwłaszcza jeśli jej oś główna znacznie odbiega od linii prostej.



Rys. 4.1. Obraz  $L_{\alpha_s}(m, n) > 0$

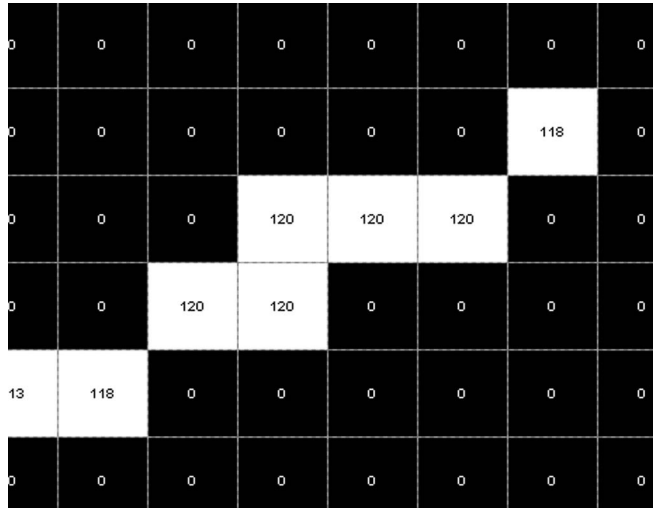
Podejście lokalne analizy kąta nachylenia mikrotubul obejmuje pomiar stopnia nachylenia poszczególnych pikseli liczony jako kąt nachylenia stycznej w danym punkcie. Wyniki analizy, kąt nachylenia są zapisywane jako wartości pikseli obiektu z rys. 3.10, i 3.11.

Na rysunku 4.1 umieszczono wynik analizy dla jednej mikrotubuli, zgodnie z zależnością (3.7).



Rys. 4.2. Obraz  $L_{\alpha^*}$  z rys. 4.1, z zaznaczoną linią czerwoną ( $\varphi_{*st.} = 115^\circ$ ), będącą wartością średnią obliczonych kątów, oraz zieloną ( $\varphi_{*med.} = 118^\circ$ ) dla wartości mediany

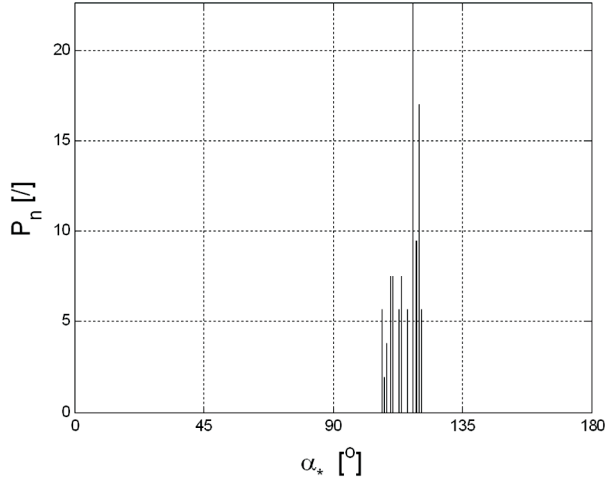
Do dalszych obliczeń różnic między podejściem globalnym a lokalnym (obszarowym) wykorzystano mikrotubulę widoczną na rys. 4.1, uzupełniając obraz liniami o nachyleniu będącym wartościami średnimi kątów  $L_{\alpha^*}$  oraz medianą (rys. 4.2).



Rys. 4.3. Wybrany fragment obrazu  $L_{\alpha^*}$  z rys. 4.1

Wartości pikseli podano w skali kątowej

Na rysunku 4.4 przedstawiono histogram podejścia lokalnego do jednej mikrotubuli.



Rys. 4.4. Histogram stopni nachylenia punktów mikrotubuli  
Wartość maksymalna na histogramie dla wartości kąta  $\alpha_* = 118^\circ$

Zmienna  $P_n$  (na rys. 4.4) oznacza procentowy udział kąta  $\alpha_*$  w powierzchni całej mikrotubuli, tj.:

$$P_n(\alpha_*) = \frac{\text{hist}(\alpha_*)}{\sum_{\alpha_*=0}^{180} \sum_{m=1}^M \sum_{n=1}^N \rho(\alpha_*, L_{\alpha_*}(m, n))} \cdot 100, \quad (4.1)$$

gdzie:

$$\text{hist}(\alpha_*) = \sum_{m=1}^M \sum_{n=1}^N \rho(\alpha_*, L_{\alpha_*}(m, n)), \quad (4.2)$$

$$\rho(\alpha_*, L_{\alpha_*}(m, n)) = \begin{cases} 1 & \text{dla } L_{\alpha_*}(m, n) = \alpha_*, \\ 0 & \text{dla } L_{\alpha_*}(m, n) \neq \alpha_*. \end{cases} \quad (4.3)$$

Na rysunku 4.2 pokazano dodatkowo dwie proste nachylone pod kątem  $\varphi_{*med.}$  oraz  $\varphi_{*sr.}$ , tj.:

$$\varphi_{*sr.} = \frac{1}{K} \cdot \sum_{k=1}^K \alpha_*(k), \quad (4.4)$$

$$\varphi_{*med.} = \text{med.}_{k \in (1, K)} (\alpha_*(k)), \quad (4.5)$$

po czym błąd, jaki wystąpił między kątami  $\varphi_{*med.}$  oraz  $\varphi_{*sr.}$  a  $\alpha_*(k)$  poddano analizie, wykorzystując następujące zależności:

$$\delta_{\varphi_{*sr.}, \alpha_*} = \sqrt{\frac{1}{(K-1)} \cdot \sum_{k=1}^K ((\alpha_*(k) - \varphi_{*sr.}))^2}, \quad (4.6)$$

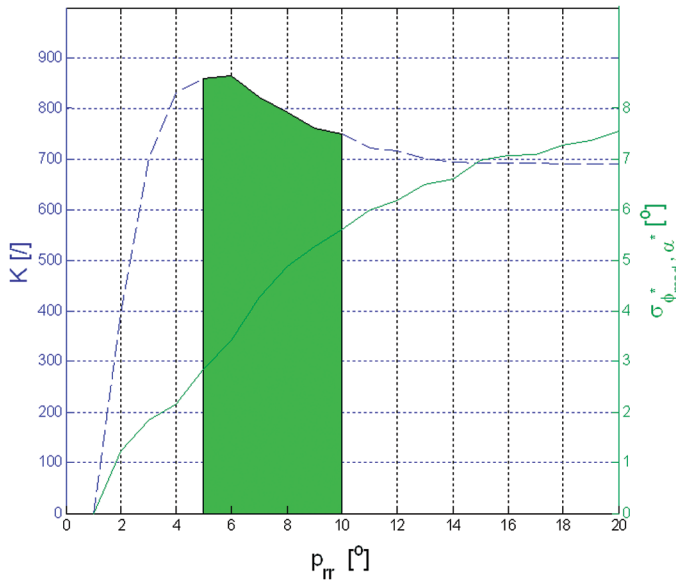
$$\delta_{\varphi_{*med.}, \alpha_*} = \sqrt{\frac{1}{(K-1)} \cdot \sum_{k=1}^K ((\alpha_*(k) - \varphi_{*med.}))^2}. \quad (4.7)$$

Błędy te, opisane zależnościami (4.6) i (4.7), wzrastają proporcjonalnie do stopnia zakrzywienia mikrotubuli, ponieważ z założenia jest ona przybliżana linią prostą. Można zatem przypuszczać, iż błąd będzie tym większy, im większa będzie wartość progu podziału mikrotubuli  $p_{rr}$  zgodnie z zależnościami (3.25), (3.26), (3.27).

Za odmienny należy uznać problem wpływu progów ustalanych arbitralnie ( $p_r$  i  $p_{rr}$ ) na otrzymywane rezultaty. Istotna będzie zatem wrażliwość na fluktuacje argumentów podczas rozpatrywania opisywanego algorytmu jako funkcji wielu zmiennych, zarówno w ujęciu lokalnym (obszarowym), jak i globalnym, tj.:

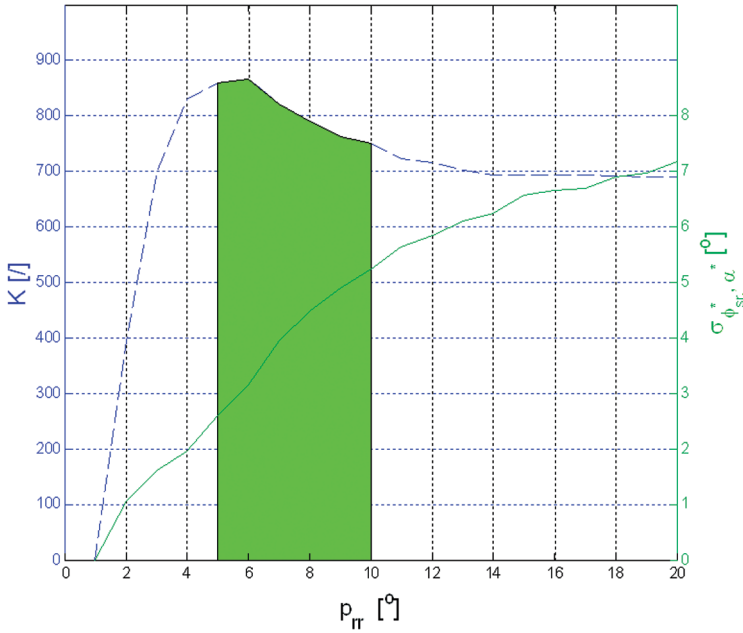
$$L_1(m, n) = f(L_{GRAY}(m, n), p_r, p_{rr}, N_W, M_W). \quad (4.8)$$

Powracając do błędów, zgodnie z wzorami (4.6), (4.7), na rys. 4.5 i 4.6 pokazano przebieg wartości odpowiednio: błędu  $\delta_{\varphi_{*med.}, \alpha_*}$  oraz  $\delta_{\varphi_{*sr.}, \alpha_*}$  w funkcji doboru progu  $p_{rr}$  oraz  $p_r$  dla przykładowego obrazu  $L_{\alpha_*}(m, n)$ .



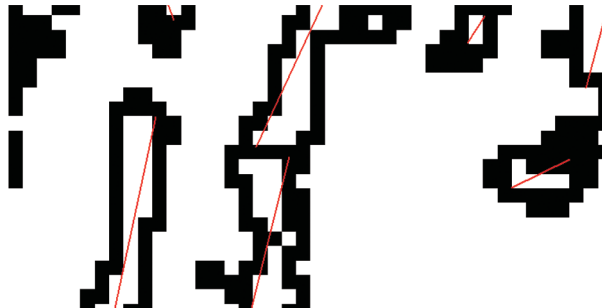
Rys. 4.5. Wykres zależności  $\delta_{\varphi_{*med.}, \alpha_*}$

Na rysunkach 4.5 i 4.6 linią ciągłą zaznaczono odpowiednio wykresy zależności  $\delta_{\varphi_{\text{med.}}, \alpha_{\text{e}}}$  oraz  $\delta_{\varphi_{\text{śr.}}, \alpha_{\text{e}}}$ , natomiast linią przerywaną pokazano odpowiednio wykresy liczby wykrytych mikrotubul  $K$  w funkcji doboru progu  $p_{\text{tr}}$ .



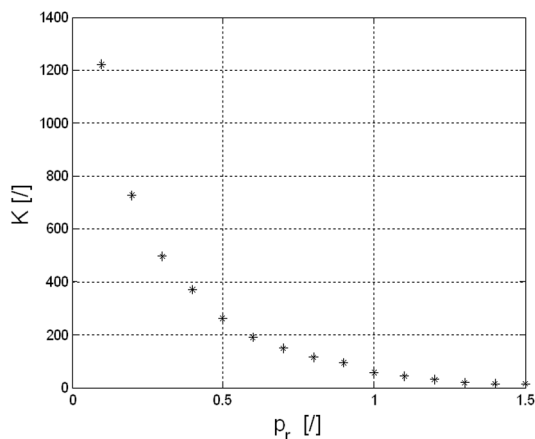
Rys. 4.6. Wykres zależności  $\delta_{\varphi_{\text{śr.}}, \alpha_{\text{e}}}$

Na wykresach (rys. 4.5 i 4.6) zaciemnionym polem pokazano optymalne wartości progu  $p_{\text{tr}}$ . Zgodnie zatem z przedstawionymi wykresami, optymalną wartość progu (biorąc pod uwagę minimalny błąd oraz maksymalną liczbę analizowanych mikrotubul) ustalono na poziomie  $p_{\text{tr}} \approx 6$ .



Rys. 4.7. Poglądowy obraz binarny krawędzi mikrotubul uzyskany dla  $p_r = 0,5$  oraz  $p_{\text{tr}} = 6$

Analizując wykres przedstawiony na rys. 4.5 i 4.6, należy zauważyć, że spadek liczby wykrytych mikrotubul dla początkowych wartości progu  $p_r$  jest spowodowany koniecznością dzielenia mikrotubuli na małe fragmenty (rys. 4.7), które w tym przypadku zostają zamienione na oddzielające je brzegi. I z tego powodu „usunięte” z obrazu, tworzą minimum widoczne na wspomnianym wykresie (rys. 4.5 i 4.6).



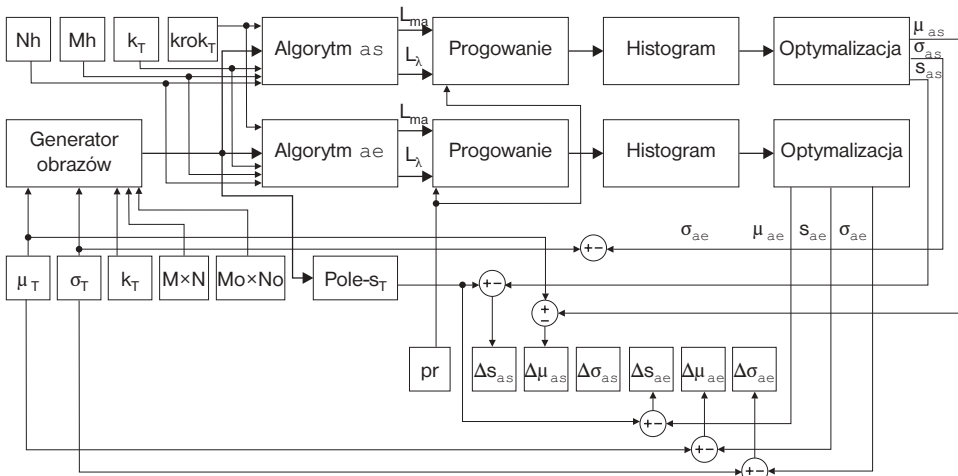
Rys. 4.8. Wykres zależności liczby rozpoznanych mikrotubul —  $K$  w funkcji doboru progu  $p_r$

Na wykresie przedstawionym na rys. 4.8 pokazano wrażliwość algorytmu na dobór progu  $p_r$  zgodnie z zależnością (3.19). Opierając się na informacji o liczbie nieprawidłowo rozpoznanych mikrotubul, ustalono wartość na poziomie  $p_r \approx 0.5$ .

## 4.2. Metodyka pomiaru własności algorytmów

Własności algorytmów  $as$  i  $ae$  (rys. 3.23 i 3.24) zostały zweryfikowane zgodnie ze schematem blokowym przedstawionym na rys. 4.9.

Sztuczny obraz wejściowy  $L_{ts}$  z liczbą  $k_T$  obiektów wydłużonych, które są ułożone zgodnie z rozkładem Gaussa, o wartości średniej kąta  $\mu_T$  oraz odchyleniu standardowym średniej  $\sigma_T$  poddaje się działaniu sprawdzanego algorytmu, który zwraca informacje o liczbie obiektów lub proporcji obiektów dla wybranych stopni nachylenia  $\lambda$  względem pozostałych. Następnie zostaje poddany analizie histogram. Wstępnie następuje estymacja parametrów rozkładu Gaussa  $\mu$  i  $\sigma$ . W poszukiwaniu estymowanych parametrów zastosowano iteracyjną metodę obliczania wartości oczekiwanej funkcji wiarygodności i jej maksymaliza-



cji (*Expectation—Maximization*) EM. Dla dwóch wybranych algorytmów, opisywanych dalej, weryfikowane są wartości różnicy dla algorytmu splotu, dalej nazywanego as, tj.:  $\Delta s_{as} = s_T - s_{as}$ ,  $\Delta \mu_{as} = \mu_T - \mu_{as}$ ,  $\Delta \sigma_{as} = \sigma_T - \sigma_{as}$ , oraz dla algorytmu erozji (również zaproponowanej przez autora (rys. 3.20), nazywanej dalej ae), tj.:  $\Delta s_{ae} = s_T - s_{ae}$ ,  $\Delta \mu_{ae} = \mu_T - \mu_{ae}$ ,  $\Delta \sigma_{ae} = \sigma_T - \sigma_{ae}$ . Uzyskiwane wyniki dla obrazów testowych będą prezentowane w dalszych podrozdziałach.

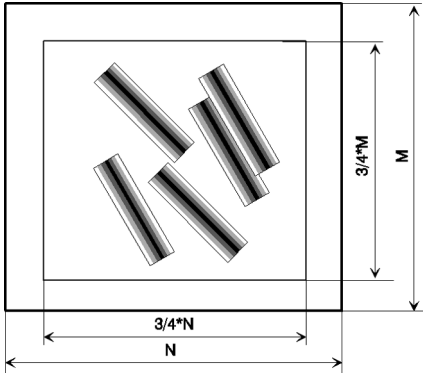
#### 4.2.1. Generator losowy obiektów wydłużonych

Opracowany generator obrazów  $L_T$  z obiektami wydłużonymi wykorzystuje rozkład Gaussa. Deklarowana jest liczba obiektów na obrazie  $k_T$ , wartość średnia  $\mu_T$  oraz odchylenia standardowe średniej  $\sigma_T$ . Rozmieszczenie obiektów w zakresie  $\frac{3}{4} \cdot M$  i  $\frac{3}{4} \cdot N$  (gdzie  $M \times N$  — rozdzielczość obrazu) zostaje przyporządkowane w sposób automatyczny zgodnie z rozkładem jednostajnym względem wierszy i kolumn oraz normalnym dla zadanej wartości oczekiwanej kąta  $\mu_T$  dla STD równego  $\sigma_T$ . Schemat poglądowy oraz przykładowy sztuczny obraz utworzony dla  $\mu_T = 135^\circ$  i  $\sigma_T = 10^\circ$  pokazano kolejno na rys. 4.10 i 4.11.

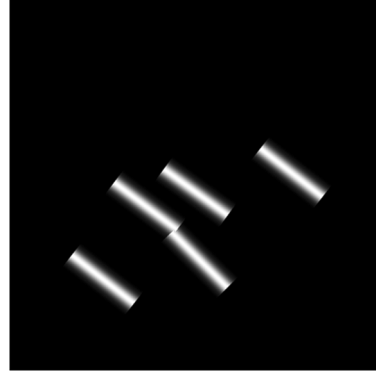
Rozmiar poszczególnych obiektów na scenie,  $400 \times 400$  pikseli, jest stały w całym procesie analizy i wynosi  $40 \times 85$  pikseli. Rozmiar ten dobrano tak, by był zbliżony do rzeczywistych obiektów występujących w analizie biologicznej np. pojedynczej mikrotubuli.



Własności opracowanych algorytmów, których schematy blokowe pokazano na rys. 3.23 (as) i 3.24 (ae), będą weryfikowane na dwóch obrazach testowych: sztucznym  $L_{ts}$  (rys. 4.12) i rzeczywistym  $L_{tr}$  (rys. 4.13).

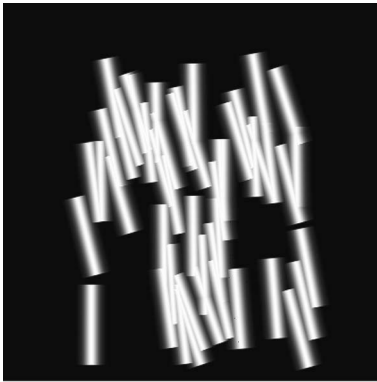


Rys. 4.10. Powstawanie sztucznego obrazu zawierającego 5 obiektów wydłużonych dla  $\mu_T = 135^\circ$  i  $\sigma_T = 10^\circ$

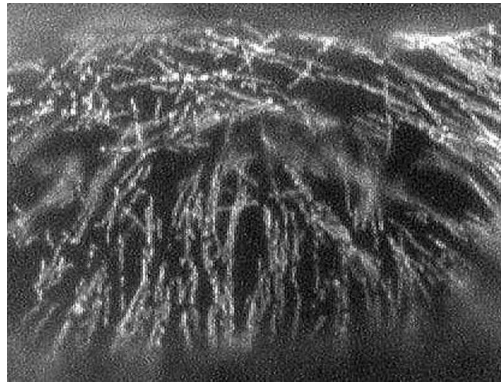


Rys. 4.11. Sztuczny obraz zawierający 5 obiektów wydłużonych dla  $\mu_T = 135^\circ$  i  $\sigma_T = 10^\circ$

Przyjęto następującą nomenklaturę: obraz wejściowy jako macierz RGB —  $L_{RGB}$ , obraz w poziomach szarości  $L_{GRAY}$ , obrazy powstałe w wyniku działania wybranych algorytmów, obraz wartości kątowych  $L_\lambda$  oraz obraz wartości maksymalnych dopasowania wzorca  $L_{ma}$ .



Rys. 4.12. Sztuczny obraz  $L_{ts}$



Rys. 4.13. Rzeczywisty obraz  $L_{tr}$

### 4.2.2. Analiza histogramów

Zgodnie z założeniem podanym na wstępie, histogramy powstałe z danych otrzymywanych w wyniku działania algorytmów są unimodalne. W związku z tym oraz na podstawie przesłanek biologicznych, np. w zastosowaniu do obliczania kąta nachylenia mikrotubul [10], [11], przyjęto model rozkładu znormalizowanego histogramu  $hist_{*T}(\lambda_T, \mu_T, \sigma_T)$  w postaci rozkładu normalnego:

$$hist_{*T}(\lambda_T, \mu_T, \sigma_T) = \frac{1}{\sigma_T \cdot \sqrt{2 \cdot \pi}} \cdot \exp \left\{ -\frac{(\lambda_T - \mu_T)^2}{2 \cdot \sigma_T^2} \right\}, \quad (4.9)$$

gdzie:

- $\lambda_T$  — kąt nachylenia (zawężony do przedziału  $0-2\pi$ ),
- $\mu_T$  — wartość oczekiwana kąta nachylenia,
- $\sigma_T$  — odchylenie standardowe średniej.

Na tej podstawie sformułowano metodę dopasowania modelu statystycznego do estymowanych parametrów  $\mu_T$  oraz  $\sigma_T$ . W ogólnym przypadku histogram  $(\lambda_T, \mu_T, \sigma_T)$  może stanowić kombinację  $c$  rozkładów Gaussowskich (wysunięto bowiem tezę [9], [10], [11], że układy mikrotubul w komórkach izolowanych pasów epidermy występują w układach unimodalnych i bimodalnych). W poszukiwaniu estymowanych parametrów zastosowano iteracyjną metodę EM obliczania wartości oczekiwanej funkcji wiarygodności i jej maksymalizacji (*Expectation—Maximization*). Metodę tę można schematycznie przedstawić w czterech krokach: inicjacja wartości parametrów modelu, obliczanie warunkowej wartości oczekiwanej logarytmu funkcji wiarygodności względem brakujących danych w analizowanej próbie i bieżących ocenach parametrów modelu, obliczanie nowych wartości parametrów modelu, sprawdzenie warunku, czy błąd jest poniżej założonego progu.

Kąt  $\lambda$  jest wartością różnicy między kątami  $\alpha$  — nachylenia stycznych do obiektu w danym pikselu, a  $\theta$  — nachylenia komórki względem osi „ $\circ x$ ” obrazu, tj.:  $\lambda = \alpha - \theta$ . Różnica ta wynika z uwzględnienia w kącie nachylenia mikrotubul ułożenia komórki względem płaszczyzny obrazu. Własność ta jest korygowana w praktycznie działających algorytmach, w których istotne staje się uniezależnienie od ułożenia preparatu względem osi mikroskopu.

Na podstawie tych założeń istotna staje się bezwzględna różnica między estymowanymi parametrami  $\mu_T, \sigma_T, s_T$ , a estymowanymi parametrami  $\mu_{as}, \sigma_{as}, s_{as}$  oraz  $\mu_{ae}, \sigma_{ae}, s_{ae}$  obliczonymi dla algorytmu as i algorytmu ae.

### 4.3. Parametry opracowanych algorytmów

Na podstawie metodyki pomiaru błędów bezwzględnych  $\Delta\mu_{as}$ ,  $\Delta\sigma_{as}$ ,  $\Delta s_{as}$ ,  $\Delta\mu_{ae}$ ,  $\Delta\sigma_{ae}$ ,  $\Delta s_{ae}$  opisaney w poprzednich rozdziałach przeprowadzono wiele pomiarów zmian wartości błędu wobec różnych parametrów wejściowych algorytmu. Do zmienianych parametrów należą:

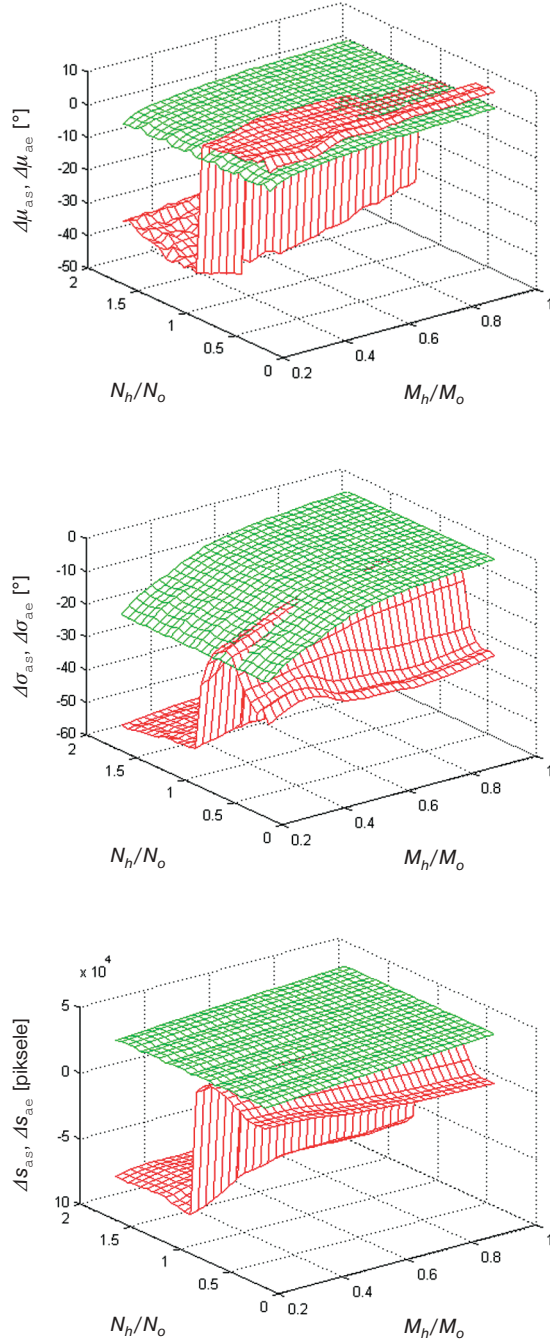
$M_h/M_o$ , $N_h/N_o$	— rozdzielczość maski $h$ w stosunku do maski obiektu,
$p_r$	— próg binaryzacji,
$k_T$	— liczba obiektów,
krok <sub>T</sub>	— krok kąta $\lambda$ .

#### 4.3.1. Wpływ zmian rozmiaru maski $h$

Pierwszą mierzoną istotną cechą porównywanych algorytmów jest wpływ rozmiaru ( $M_h$ ,  $N_h$  — liczby wierszy i kolumn) maski  $h$  na wartości  $\Delta s_{as}$ ,  $\Delta\mu_{as}$ ,  $\Delta\sigma_{as}$ ,  $\Delta s_{ae}$ ,  $\Delta\mu_{ae}$ ,  $\Delta\sigma_{ae}$ .

Obliczenia przeprowadzono dla wartości  $M_o \times N_o = 85 \times 40$  pikseli oraz  $M \times N = 400 \times 400$  pikseli,  $\mu_T = 90^\circ$ ,  $\sigma_T = 20^\circ$ ,  $k_T = 5$ ,  $p_r = 0,5$ ,  $\varepsilon_{mi} = -3$ ,  $\varepsilon_{ma} = 4$  i krok<sub>T</sub> = 10°, otrzymując wyniki przedstawione na rys. 4.14.

Przedstawione wyniki wskazują jednoznacznie na dużą zależność algorytmu  $as$  od stosunku liczby kolumn obiektu wejściowego  $N_o$  liczby kolumn  $N_h$  maski  $h$ . Gwałtowna zmiana wartości  $\Delta\mu_{as}$  zachodzi w przypadku  $N_h/N_o \cong 1$ . W przypadku  $N_h/N_o > 1$  wzrasta, w stosunku do wartości bezwzględnej, różnica w wartości średniej  $\Delta\mu_{as}$ , odchyleniu standardowym  $\Delta\sigma_{as}$  oraz różnica w polu powierzchni  $\Delta s_{as}$ . Rezultat ten jest spowodowany dużą selektywnością algorytmu  $as$  w stosunku do algorytmu  $ae$ , gdzie dla  $N_h/N_o > 1$  wynik splotu z maską  $h$  daje w efekcie za małe wartości (niską liczbę pikseli) odcinane kolejno w rezultacie progowania wartością progu  $p_r$ . Dlatego też algorytm  $ae$ , ze względu na specyfikę maski, cechuje brak selektywności wraz z błędem w wartościach oczekiwanych  $\Delta\mu_{as}$  poniżej 10°. Uogólniając, można zaproponować algorytm  $ae$  wszędzie tam, gdzie nie jest wymagana selektywność działania algorytmu (możliwość wydzielania określonych obiektów wydłużonych o zadanych rozmiarach  $M_h \times N_h$ ) oraz algorytm  $as$  tam, gdzie jest to wymagane. Jak wynika z rys. 4.14, zmiana  $M_h/M_o$  w niewielkim stopniu wpływa na różnice w wartościach średnich  $\Delta\mu_{as}$ ,  $\Delta\mu_{ae}$  oraz w wartościach różnicy pól powierzchni  $\Delta s_{as}$ ,  $\Delta s_{ae}$ . Wartości  $M_h/M_o < 0,6$  oddziałują na zwiększenie wartości odchylenia standardowego średniej w wyniku zaniżenia długości maski (liczby wierszy) w sto-



Rys. 4.14. Wykresy zmian  $\Delta\mu_{as}$ ,  $\Delta\mu_{ae}$ ,  $\Delta\sigma_{as}$ ,  $\Delta\sigma_{ae}$ ,  $\Delta s_{as}$ ,  $\Delta s_{ae}$  dla różnych wartości  $N_h/N_o$  oraz  $M_h/M_o$

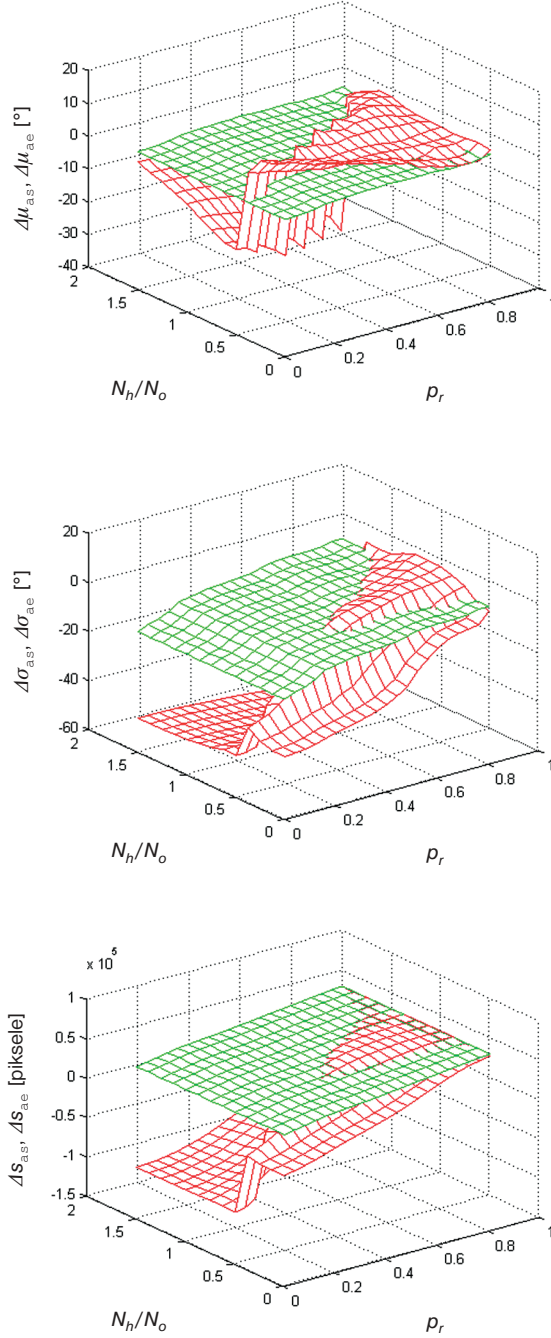
sunku do długości poszukiwanego elementu, a zatem optymalne, w sensie minimalizacji błędu wartości średniej oraz odchylenia standardowego, ustawienia to  $M_h/M_o > 0,5$ ,  $N_h/N_o \cong 1$ . Czas trwania symulacji dla komputera PC z procesorem PII 1.33, pamięcią RAM 1GB realizującego algorytm as wynosi 3,37 h, a algorytm ae — 5,44 h.

### 4.3.2. Wpływ zmian progu $p_r$

Wartość doboru progu  $p_r$  w przyjętych algorytmach jest ustawiana na 0,5. Jednak w ogólnym przypadku może być zmieniana w zależności od jakości obrazu oraz istotności obiektów niespełniających dokładnie warunku rozpatrywanego poprzednio, czyli  $N_h/N_o \cong 1$ .

Na rysunku 4.15 pokazano wpływ zmian wartości  $N_h/N_o \in (0,1, 2,0)$  oraz progu  $p_r \in (0,1, 1,0)$  na zmiany  $\Delta s_{as}$ ,  $\Delta \mu_{as}$ ,  $\Delta \sigma_{as}$ ,  $\Delta s_{ae}$ ,  $\Delta \mu_{ae}$ ,  $\Delta \sigma_{ae}$ .

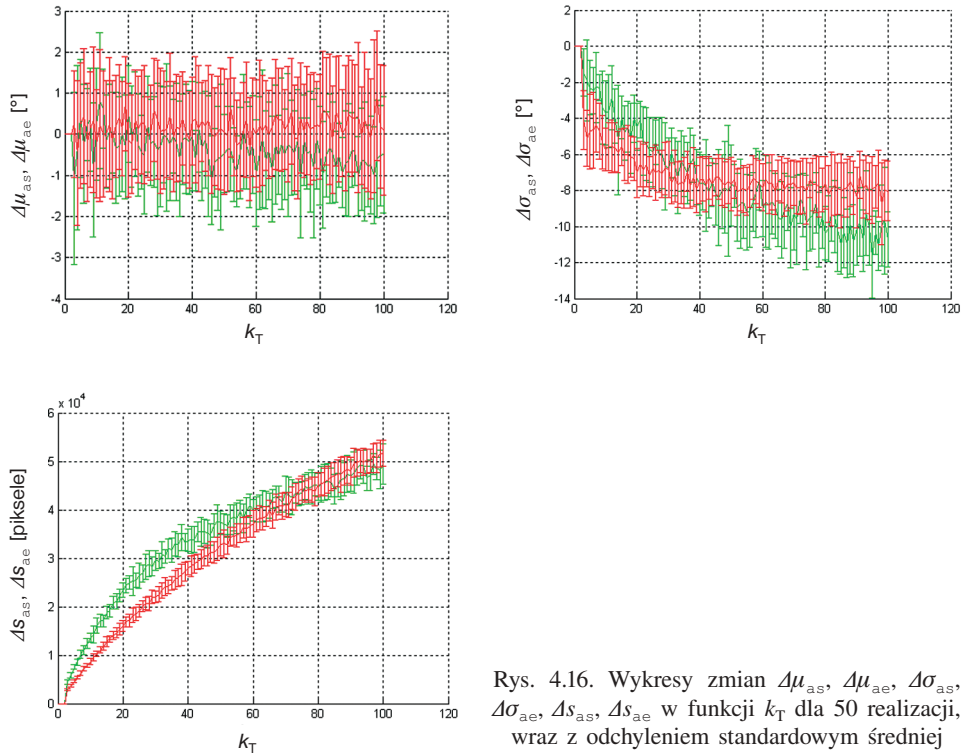
Zwiększanie wartości progu  $p_r$  dla algorytmu as, przyczynia się do poprawy dokładności obliczeń kąta nachylenia ( $\Delta \mu_{as}$ ) oraz do zmniejszenia odchylenia standardowego ( $\Delta \sigma_{as}$ ) kosztem zmniejszenia całkowitego pola powierzchni analizowanych obiektów ( $\Delta s_{as}$ ). Zbliżone wartości błędu  $\Delta \mu_{as}$  dla algorytmu as występują w odwrotnej zależności między  $N_h/N_o$  a  $p_r$ . Wynika z tego, że chcąc otrzymać wynik obarczony niewielkim błędem ( $|\Delta \mu_{as}| < 10$ ), należy przez zwiększenie stosunku  $N_h/N_o$  zmniejszyć wartość progu  $p_r$  i na odwrót. Wartość progu  $p_r$  przyjęto na poziomie 0,5. Algorytm ae nie wykazuje znacznej, tzn. przekraczającej 10%, czułości na zmiany  $N_h/N_o$  w zakresie od 0,1 do 2 oraz progu  $p_r$  od 0 do 1. Czas trwania symulacji dla komputera PC z procesorem PII 1.33, pamięcią RAM 1GB realizującego algorytm as wynosi 0,29 h, a algorytm ae — 0,72 h.



Rys. 4.15. Wykresy zmian  $\Delta\mu_{as}$ ,  $\Delta\mu_{ae}$ ,  $\Delta\sigma_{as}$ ,  $\Delta\sigma_{ae}$ ,  $\Delta s_{as}$ ,  $\Delta s_{ae}$  dla różnych wartości  $N_h/N_o$  oraz progu  $p_r$

### 4.3.3. Wpływ liczby obiektów na scenie

Pomiary przeprowadzono dla wartości:  $M_o \times N_o = 85 \times 40$  pikseli oraz  $M \times N = 400 \times 400$  pikseli,  $M_h \times N_h = 45 \times 30$  pikseli,  $\mu_T = 90^\circ$ ,  $\sigma_T = 20^\circ$ ,  $p_r = 0.3$ ,  $\text{krok}_T = 10^\circ$ ,  $\varepsilon_{mi} = -3$ ,  $\varepsilon_{ma} = 4$  i  $k_T = 10$ , obserwując zmiany  $\Delta\mu_{as}$ ,  $\Delta\mu_{ae}$ ,  $\Delta\sigma_{as}$ ,  $\Delta\sigma_{ae}$ ,  $\Delta s_{as}$ ,  $\Delta s_{ae}$  dla 50 realizacji dla  $k_T \in (1, 100)$ . Otrzymane wyniki przedstawiono na rys. 4.16.



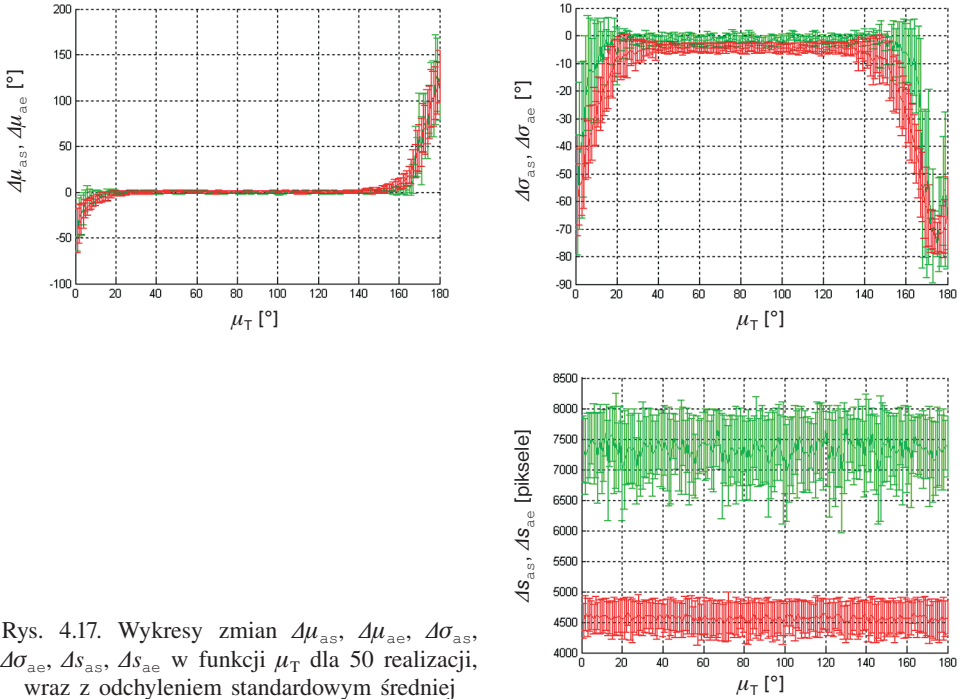
Rys. 4.16. Wykresy zmian  $\Delta\mu_{as}$ ,  $\Delta\mu_{ae}$ ,  $\Delta\sigma_{as}$ ,  $\Delta\sigma_{ae}$ ,  $\Delta s_{as}$ ,  $\Delta s_{ae}$  w funkcji  $k_T$  dla 50 realizacji, wraz z odchyleniem standardowym średniej

Z wykresu (rys. 4.16)  $\Delta\mu_{as}$ ,  $\Delta\mu_{ae}$  w funkcji  $k_T$  wynika, że zwiększając liczbę obiektów na scenie, nie zmienia się (lub zmienia się w bardzo niewielkim stopniu) mierzona wartość średnia  $\mu_{as}$ ,  $\mu_{ae}$ , wzrasta natomiast odchylenie standardowe  $\sigma_{as}$  i  $\sigma_{ae}$ . Wzrost wartości  $\sigma_{ae}$  dla rosnącej liczby obiektów  $k_T$  potwierdza mniejsza selektywność algorytmu ae w stosunku do as. Czas trwania symulacji dla komputera PC z procesorem PII 1,33, pamięcią RAM 1GB realizującego algorytm as wynosi 14 h, a algorytm ae — 29,4 h.



#### 4.3.4. Wpływ kąta nachylenia obiektów na scenie

Podobnie jak w przypadku pomiarów oceny wrażliwości algorytmów na liczbę obiektów na scenie, pomiary i w tym przypadku przeprowadzono dla wartości  $M_o \times N_o = 85 \times 40$  pikseli oraz  $M \times N = 400 \times 400$  pikseli,  $M_h \times N_h = 45 \times 30$  pikseli,  $\sigma_T = 20^\circ$ ,  $p_r = 0,3$ ,  $\varepsilon_{mi} = -3$ ,  $\varepsilon_{ma} = 4$  i  $k_T = 10^\circ$ , obserwując zmiany  $\Delta\mu_{as}$ ,  $\Delta\mu_{ae}$ ,  $\Delta\sigma_{as}$ ,  $\Delta\sigma_{ae}$ ,  $\Delta s_{as}$ ,  $\Delta s_{ae}$  dla 50 realizacji  $\mu_T \in (0, 180)$ . Otrzymane wyniki przedstawiono na rys. 4.17.



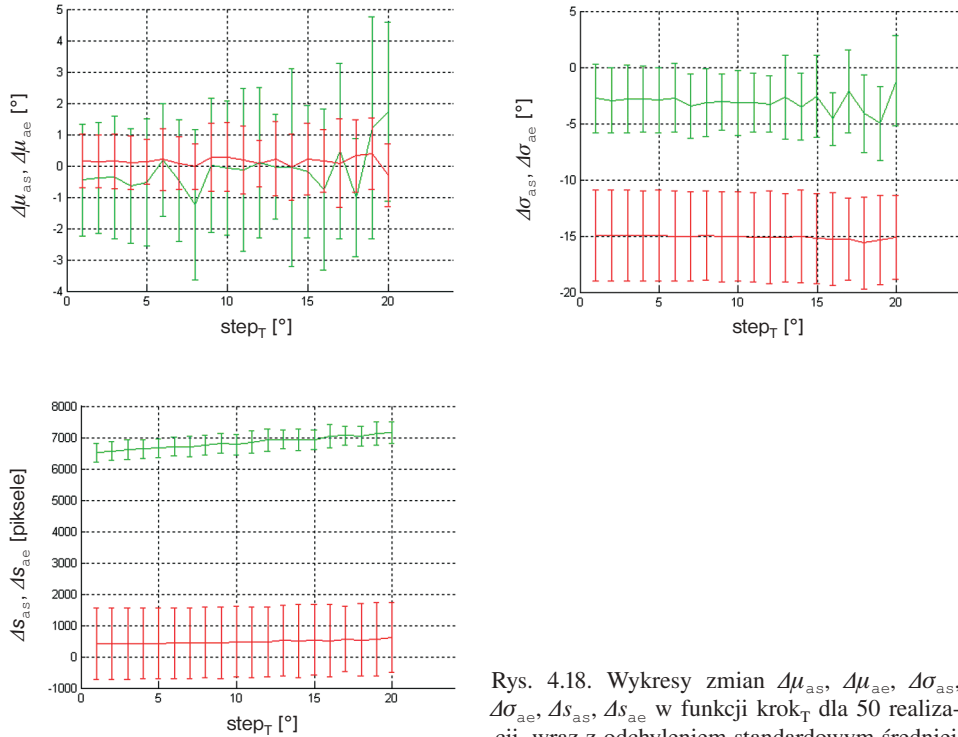
Rys. 4.17. Wykresy zmian  $\Delta\mu_{as}$ ,  $\Delta\mu_{ae}$ ,  $\Delta\sigma_{as}$ ,  $\Delta\sigma_{ae}$ ,  $\Delta s_{as}$ ,  $\Delta s_{ae}$  w funkcji  $\mu_T$  dla 50 realizacji, wraz z odchyleniem standardowym średniej

Zarówno algorytm as, jak i ae wykazują znaczne uprzywilejowanie skrajnych kierunków. Wynika to z faktu przybliżania kształtu histogramu rozkładem Gaussowskim, który nie w pełni pozwala wyznaczyć skrajne wartości kąta z wartościami średnimi  $\mu_T$ . Niedogodność tą można zniwelować jeśli powstały histogram traktuje się jako opisany na okręgu. Dokładność obliczeń wartości średniej kąta nachylenia dla dwóch analizowanych algorytmów jest zbliżona, lecz dla algorytmu as występuje większa wartość odchylenia standardowego średniej  $\sigma_{ae}$ . Pole powierzchni wszystkich obiektów na scenie jest porównywalne, co wynika z charakteru obliczeń. Czas trwania symulacji dla komputera PC z procesorem PII 1.33, pamięcią RAM 1GB realizującego algorytm as wynosi 10,1 h, a algorytm ae — 52,9 h.



### 4.3.5. Wpływ doboru kroku działania algorytmu

Pomiary przeprowadzono dla wartości  $M_o \times N_o = 85 \times 40$  pikseli oraz  $M \times N = 400 \times 400$  pikseli,  $M_h \times N_h = 45 \times 30$  pikseli,  $\sigma_T = 20^\circ$ ,  $p_r = 0,3$ ,  $\varepsilon_{mi} = -3$ ,  $\varepsilon_{ma} = 4$  i  $\mu_T = 92^\circ$ , obserwując zmiany  $\Delta\mu_{as}$ ,  $\Delta\mu_{ae}$ ,  $\Delta\sigma_{as}$ ,  $\Delta\sigma_{ae}$ ,  $\Delta s_{as}$ ,  $\Delta s_{ae}$  50 realizacji dla  $k_T \in (1,20)$ . Otrzymane wyniki przedstawiono na rys. 4.18.



Rys. 4.18. Wykresy zmian  $\Delta\mu_{as}$ ,  $\Delta\mu_{ae}$ ,  $\Delta\sigma_{as}$ ,  $\Delta\sigma_{ae}$ ,  $\Delta s_{as}$ ,  $\Delta s_{ae}$  w funkcji  $k_T$  dla 50 realizacji, wraz z odchyleniem standardowym średniej

Z analizy wykresów (rys. 4.18) wynika duża wrażliwość algorytmu ae na zwiększanie wartości  $k_T$ . Utrzymywana jest w tym czasie, dla różnych wartości zmiennej  $k_T$ , zaniżona wartość całkowitego pola powierzchni  $s_b$  analizowanych obiektów na scenie. Algorytm as w tym przypadku jest mniej wrażliwy na zwiększanie wartości kroku przy stosunkowo dużej jednak wartości odchylenia standardowego średniej  $\sigma_{as}$  (rys. 4.18).

Dodatkowo algorytm ae zaniża wartość średnią  $\mu_{ae}$ . Optymalny dobór zmiennej  $k_T$  zależy od zamierzonej uzyskiwanej dokładności, przy czym dla algorytmu ae zwiększanie wartości  $k_T$  powoduje zmniejszenie powierzchni obiektów. Czas trwania symulacji dla komputera PC z procesorem PII 133, pamięcią RAM 1GB realizującego algorytm as wynosi 1,5 h, algorytm ae — 9,5 h.

## 4.4. Podsumowanie

Analizę wpływu poszczególnych zmiennych zamieszczono w tabeli 1.1.

Tabela 4.1. Zestawienie zmiany wrażliwości algorytmów as i ae

Zmienna	$ \Delta\mu_{as} $	$ \Delta\mu_{ae} $	$ \Delta\sigma_{as} $	$ \Delta\sigma_{ae} $	$ \Delta s_{as} $	$ \Delta s_{ae} $
$p_r \uparrow$	↓	—	↓	—	↓	—
$M_h/M_o \uparrow$	—	—	↑	↑	—	—
$N_h/N_o \uparrow$	↑	—	↑	—	↑	—
$k_T \uparrow$	—	—	↑	↑	↑	↑
$\mu_T \uparrow$	—	—	—	—	—	—
$krok_T \uparrow$	—	↑	—	—	—	↑

Objaśnienia: ↓ — maleje, ↑ — rośnie, — brak wpływu.

Z przedstawionej tabeli wynika, że większą selektywnością charakteryzuje się algorytm as, będąc jednocześnie bardziej wrażliwym na zmianę  $N_h/N_o$ . Algorytm ae co prawda jest mniej wrażliwy, jednak jest znacznie mniej dokładny w przypadku większej liczby obiektów na scenie.

Przedstawione algorytmy stanowią fundamentalny moduł niezbędny do automatycznego pomiaru obiektów wydłużonych biologicznych, dla których istotne są cechy takie, jak:

- pole powierzchni obiektu,
- liczba obiektów na scenie,
- mała wrażliwość na szumy.

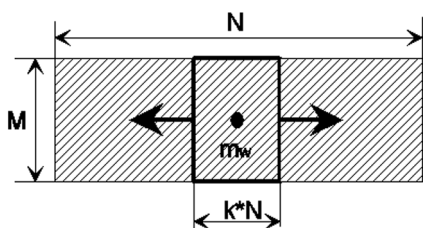
Algorytm as (i zamiennie ae) znajduje zastosowanie w kilku placówkach biologicznych jako część aplikacji do automatycznego wyznaczania kąta nachylenia mikrotubul.

## 5. ANALIZA ZMIENNOŚCI KĄTA NACHYLENIA MIKROTUBUL

### 5.1. Obszarowa analiza kąta nachylenia mikrotubul

Jeśli analizuje się kąt nachylenia mikrotubul w praktyce, niejednokrotnie rezultaty otrzymywane z analizy globalnej nie są w pełni zadowalające. Dzieje się tak w przypadku zmienności kąta nachylenia mikrotubul w badanym obszarze. Z tego powodu niezbędne jest dokonanie analizy lokalnej — wykonywanej w ściśle określonym obszarze.

Ideę analizy obszarowej poglądowo przedstawiono na rys. 5.1.



Rys. 5.1. Schemat poglądowy analizy obszarowej kąta nachylenia mikrotubul

Na rysunku 5.1 jest widoczny analizowany zakres, w którym mierzy się kąt nachylenia o rozdzielczości  $M \times k \cdot N$  (gdzie:  $k$  jest stałą z zakresu 0—1). Wartości doboru stałej  $k$  wpływają na przedział całkowania kątów nachylenia. Dla każdego ze wspomnianych obszarów o rozdzielczości  $M \times k \cdot N$  najpierw oblicza się histogram  $hist_i$  (gdzie  $i$  oznacza numer obszaru), a następnie wartość kąta, której maksimum występuje na histogramie:

$$hist_i(\lambda_{i*}) = \max_{\lambda \in [0, 180)} (hist_i(\lambda)), \quad (5.1)$$

gdzie:

- $\lambda_{i^*}$  — wartość kąta nachylenia dla  $i$ -tego obszaru obliczona jako wartość kąta  $\lambda_{i^*}$ , dla którego występuje maksimum na histogramie  $\text{hist}_i(\lambda)$ ,
- $\lambda$  — kąt nachylenia mikrotubul w analizowanym obszarze,

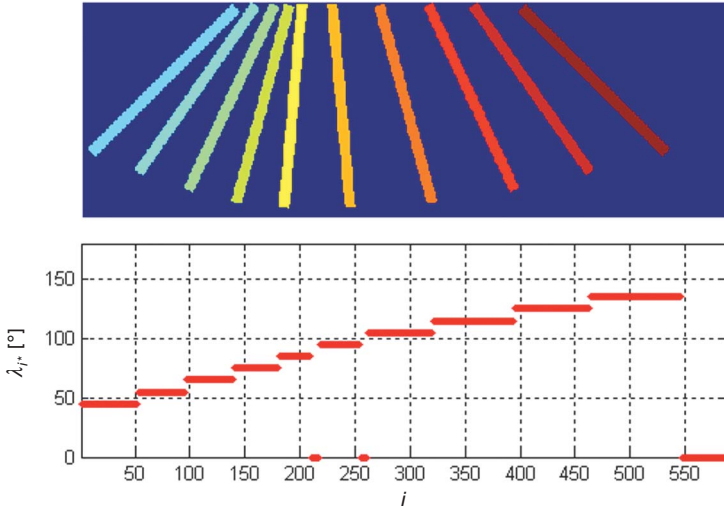
oraz

$$\text{hist}_i(\lambda) = \sum_{m=1}^M \sum_{n=1}^{k \cdot N} \rho(\lambda, L_{\lambda,i}(m, n)), \quad (5.2)$$

$$\rho(\lambda, L_{\lambda,i}(m, n)) = \begin{cases} 1 & \text{dla } L_{\lambda,i}(m, n) = \lambda, \\ 0 & \text{dla } L_{\lambda,i}(m, n) \neq \lambda \end{cases} \quad (5.3)$$

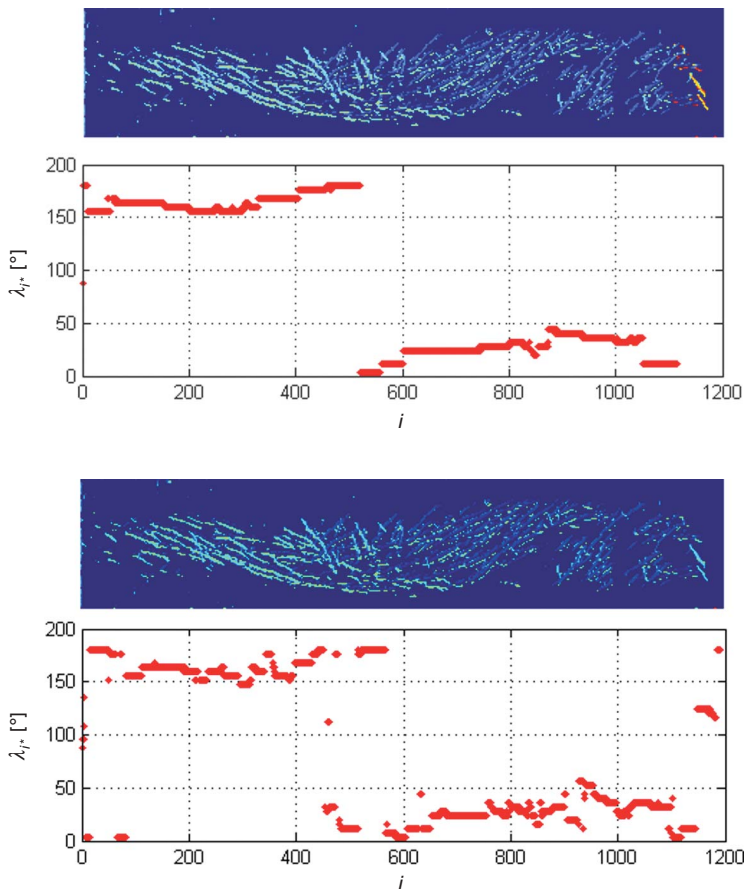
dla  $\lambda \in [0, 180)$ .

Obliczony w ten sposób kąt  $\lambda_{i^*}$  pokazano na rys. 5.2 dla sztucznego obrazu o rozdzielczości  $M \times N = 200 \times 600$ .



Rys. 5.2. Sztuczny obraz wejściowy oraz analiza kąta nachylenia dla  $k = 0,05$

Dla obrazu rzeczywistego o rozdzielczości  $M \times N = 989 \times 4863$  wyniki przedstawiono na rys. 5.3 dla parametru  $k = 0,05$  oraz  $k = 0,02$ .

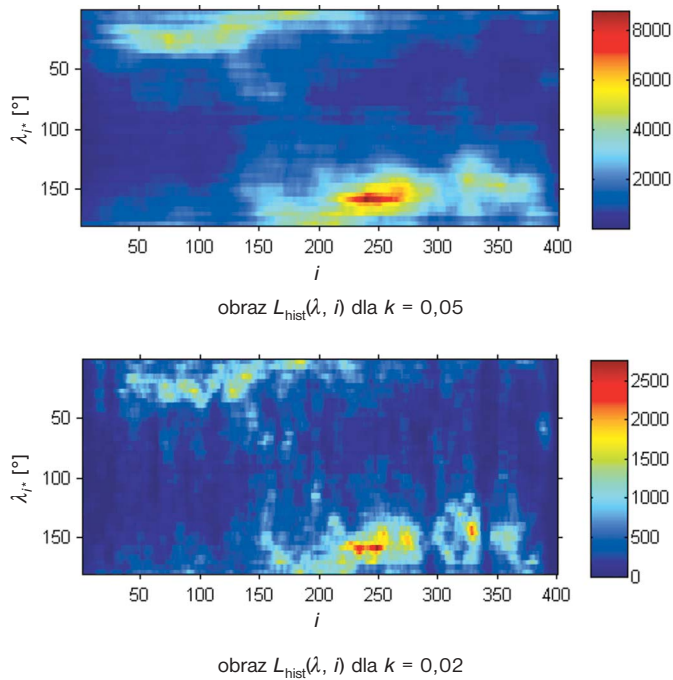


Rys. 5.3. Przykład kąta nachylenia  $\lambda_{i*}(i)$  odpowiednio dla  $k = 0,05$  i  $k = 0,02$

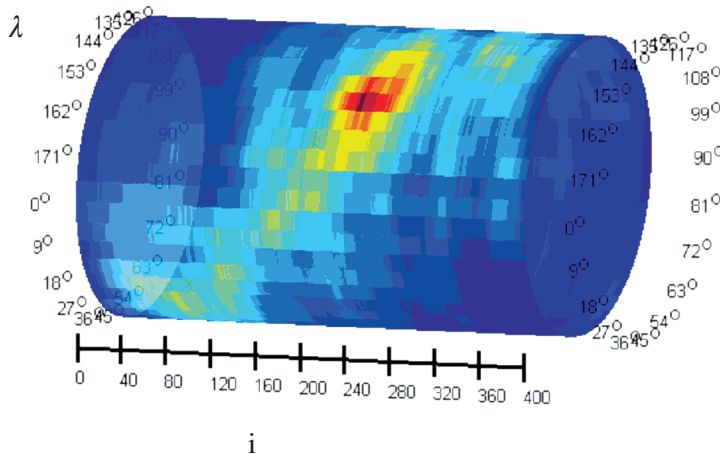
W praktyce okazuje się, że przedstawienie uzyskiwanych wyników w postaci wykresu, pokazanego na rys. 5.3, nie jest wystarczające. Brakuje bowiem informacji na temat pozostałych składowych dla innych kątów występujących np. w przypadku histogramu bimodalnego. Wydaje się zatem uzasadnione pokazanie jako wyniku końcowego rodziny histogramów uzyskiwanych dla kolejnych wartości  $i$ . Otrzymany obraz  $L_{\text{hist}}(\lambda, i)$  dla rodziny histogramów  $\text{hist}_i(\lambda)$ , zapisanych kolumnowo można zdefiniować następująco:

$$L_{\text{hist}}(\lambda, i) = \frac{[\text{hist}_1(\lambda), \text{hist}_2(\lambda), \dots, \text{hist}_i(\lambda)]}{i}. \quad (5.4)$$

Przykładowe obrazy  $L_{\text{hist}}$  dla  $k = 0,05$  i  $k = 0,02$  są widoczne na rys. 5.4.

Rys. 5.4. Przykład analizy kąta nachylenia obrazu  $L_{\text{hist}}(\lambda, i)$ 

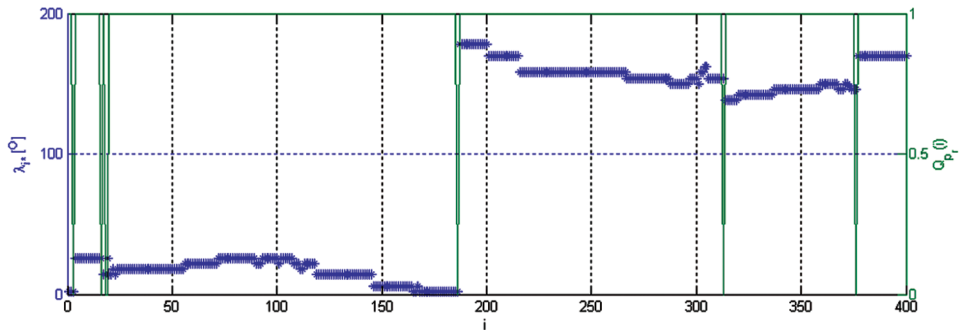
Przedstawione w formie histogramów obrazy (rys. 5.4) charakteryzuje brak ciągłości w wartościach kątowych między  $180^\circ$  a  $0^\circ$ . Z tego powodu w celach wizualizacji wykorzystano obiekt cylindryczny, na którym naniesiono obraz rodziny histogramów  $L_{\text{hist}}(\lambda, i)$ , co ilustruje rys. 5.5.

Rys. 5.5. Przykładowy obraz kołowy histogramów  $L_{\text{hist}}$  dla  $k = 0,05$

Analizując zarówno obraz z rys. 5.4, jak i z rys. 5.5, a także wykresy przedstawione na rys. 5.3, trudno jednoznacznie ocenić brakujące wartości kąta nachylenia mikrotubul oraz kształt przebiegu zmian kąta nachylenia. W związku z tym zaproponowano analizę obrazu  $L_{\text{hist}}$  w taki sposób, że modyfikacji podlegał kształt wykresu  $\lambda_{i*}(i)$ . Wartości  $\lambda_{i*}(i)$  dla kolejnych  $i$  analizowano pod względem zaproponowanego kryterium jakości w celu oddzielenia ciągłych wartości, tj.:

$$Q(i) = \frac{2 \cdot (\lambda_{i*}(i+1) - \lambda_{i*}(i))}{\text{hist}_{i+1}(\lambda_{i*}) + \text{hist}_i(\lambda_{i*})}. \quad (5.5)$$

W przypadku gdy dla kolejno analizowanych  $\lambda_{i*}(i)$  wartość  $Q(i)$  przekraczała dopuszczalny próg  $p_r$ , wówczas w tym miejscu przebieg był dzielony. Liczba podziałów przebiegu  $\lambda_{i*}(i)$  zależy od przyjętego progu  $p_r$ . Przykładowy podział, z wykorzystaniem kryterium  $Q(i)$  dla  $p_r = 40$ , pokazano na rys. 5.6,

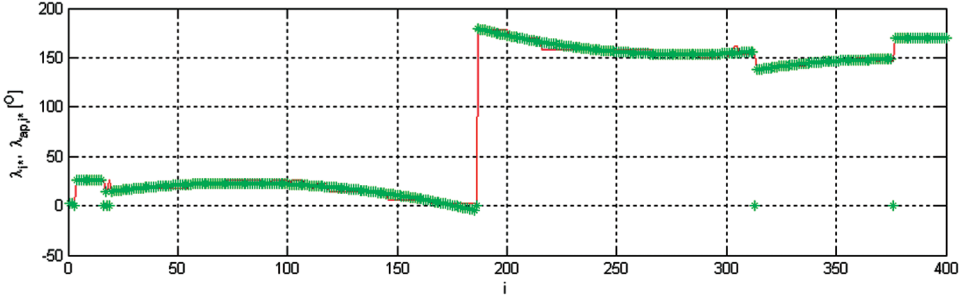


Rys. 5.6. Przebiegi  $\lambda_{i*}(i)$  i  $Q_{pr}(i)$  przy podziale na 5 części

gdzie  $Q_{pr}(i)$ :

$$Q_{pr}(i) = \begin{cases} 1 & \text{if } Q(i) \geq p_r \\ 0 & \text{if } Q(i) < p_r \end{cases}. \quad (5.6)$$

Dla każdego fragmentu przebiegu  $\lambda_{i*}(i)$  widocznego na rys. 5.6 przeprowadzono aproksymację wielomianem trzeciego rzędu. Uzyskane wyniki w postaci  $\lambda_{ap, i*}(i)$  pokazano na rys. 5.7.



Rys. 5.7. Przebiegi  $\lambda_{i^*}(i)$  — czerwony, i  $\lambda_{ap, i^*}(i)$  — zielony, przy podziale na 5 części

Na tej podstawie  $\lambda_{ap, i^*}(i)$  można zapisać jako sumę wielomianów trzeciego rzędu np.:

$$\lambda_{ap, i^*}(i) = \begin{cases} \lambda^I = 26 & \text{dla } i \in (1, 20), \\ \lambda^{II} = 8,18 + 0,37 \cdot i - 0,0024 \cdot i^2 & \text{dla } i \in (21, 185), \\ \lambda^{III} = 386 - 1,65 \cdot i + 0,0029 \cdot i^2 & \text{dla } i \in (186, 312), \\ \lambda^{IV} = -274 + 2,26 \cdot i - 0,003 \cdot i^2 & \text{dla } i \in (313, 375), \\ \lambda^V = 170 & \text{dla } i \in (376, 400). \end{cases} \quad (5.7)$$

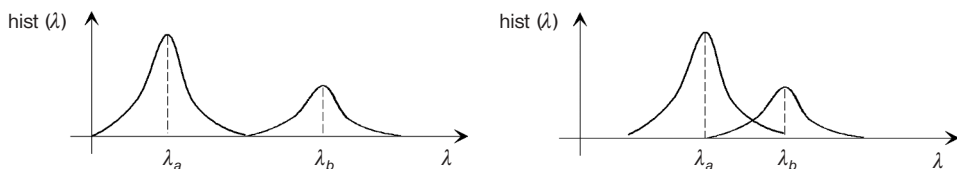
Z przedstawionych aproksymacji przedziałami wielomianem trzeciego rzędu widać nieliniowość zmian wartości kąta nachylenia oraz nieciągłości. Obecne hipotezy związane z czynnikami oddziałującymi na roślinę, takimi jak naprężenia, potwierdzają występowanie „brakujących” wartości kątów, natomiast nie wyjaśniają całkowicie przyczyn powstawania nieliniowości.

## 5.2. Typy histogramów mikrotubul

Mikrotubule charakteryzują się dynamiczną niestabilnością — mogą być wydłużane lub skracane w krótkich odstępach czasu [10]. Własność ta jest związana ze zdolnością tubuliny do hydrolizowania GTP. Analiza otrzymywanych histogramów kąta nachylenia umożliwia globalną analizę statystyczną oraz wykrycie istotnych biologicznie zachowań, jak też anomalii.

Na podstawie publikacji [9], [11] wysunięto tezę, że układy mikrotubul w komórkach izolowanych pasów epidermy występują w układach unimodalnych i bimodalnych, co pokazano na rys. 5.8.





Rys. 5.8. Pogładowe histogramy bimodalne kąta nachylenia mikrotubul

Kąt  $\lambda$  jest wartością różnicy między kątami  $\varphi_*$  (otrzymanym z równania (4.5) a  $\Phi_*$  (otrzymanym z równania (3.39)), tj.:  $\lambda = \varphi_* - \Phi_*$  (dla podejścia lokalnego  $\alpha_* - \Phi_*$ ). Różnica ta wynika z uwzględnienia w kącie nachylenia mikrotubul ułożenia komórki względem płaszczyzny obrazu. Przy założeniu, że histogram bimodalny jest kombinacją wypukłą dwóch unimodalnych rozkładów Gaussa, histogram kąta nachylenia można zapisać na podstawie (3.8):

$$\begin{aligned} \text{hist}_n(\lambda_n) &\cong \text{hist}_{*n}(\lambda_n, A_{na}, A_{nb}, \sigma_a, \sigma_b) = \\ &= \text{hist}_{*na}(\lambda_n, A_{na}, \sigma_a) + \text{hist}_{*nb}(\lambda_n, A_{nb}, \sigma_b), \end{aligned} \quad (5.8)$$

$$\text{hist}_{*na}(\lambda_n, A_{na}, \sigma_a) = \frac{A_{na}}{\sigma_a \cdot \sqrt{2 \cdot \pi}} \cdot \exp \left\{ -\frac{(\lambda_n - \lambda_{na})^2}{2 \cdot \sigma_a^2} \right\}, \quad (5.9)$$

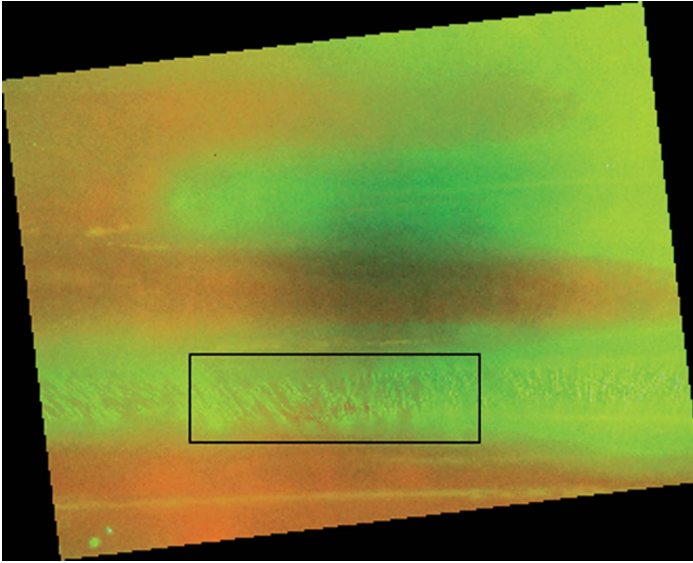
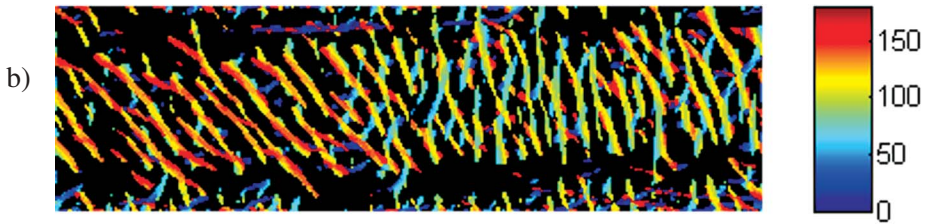
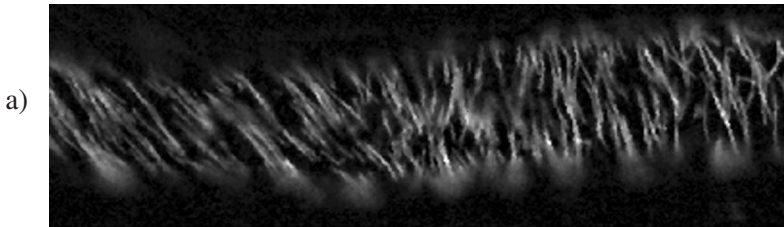
$$\text{hist}_{*nb}(\lambda_n, A_{nb}, \sigma_b) = \frac{A_{nb}}{\sigma_b \cdot \sqrt{2 \cdot \pi}} \cdot \exp \left\{ -\frac{(\lambda_n - \lambda_{nb})^2}{2 \cdot \sigma_b^2} \right\}, \quad (5.10)$$

gdzie:

- $\lambda_n$  — znormalizowany kąt nachylenia  $\lambda$  do przedziału (0,1),
- $\lambda_{na}$  — znormalizowany kąt nachylenia  $\lambda_a$  do przedziału (0,1),
- $\lambda_{nb}$  — znormalizowany kąt nachylenia  $\lambda_b$  do przedziału (0,1).

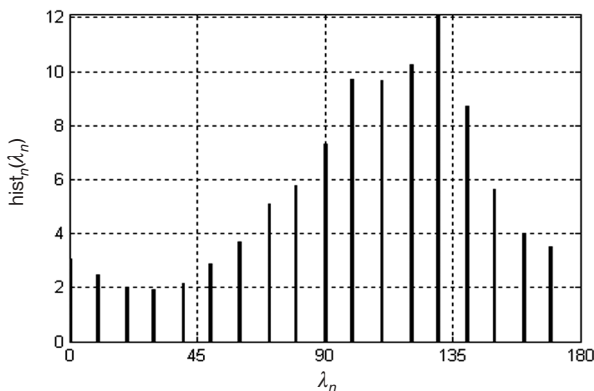
Analiza wpływu wybranego czynnika na komórkę wymusza pomiar zmienności układu mikrotubul w osi głównej komórki. W tym przypadku globalna analiza kąta nachylenia mikrotubul, związana z całym obszarem komórki, a później histogramu, nie przynosi oczekiwanych rezultatów. Na rys. 5.9 przedstawiono przykładowy obraz wejściowy, z zaznaczonym fragmentem podlegającym dalszej analizie na kolejnych rysunkach.

Fragment obrazu  $L_{\text{RGB}}(m, n)$  z rys. 5.9 uwidocznił na rys. 5.10. Na rys. 5.10 a pokazano — w poziomach szarości z korektą oświetlenia — wybrany fragment rys. 5.9, zaznaczony prostokątem, natomiast na rys. 5.10 b pokazano sztucznie stworzony obraz  $L_\lambda(m, n)$ , na którym każdy piksel reprezentowany jest miarą kątową stopnia nachylenia stycznej w tym punkcie.

Rys. 5.9. Obraz wejściowy  $L_{\text{RGB}}(m, n)$ 

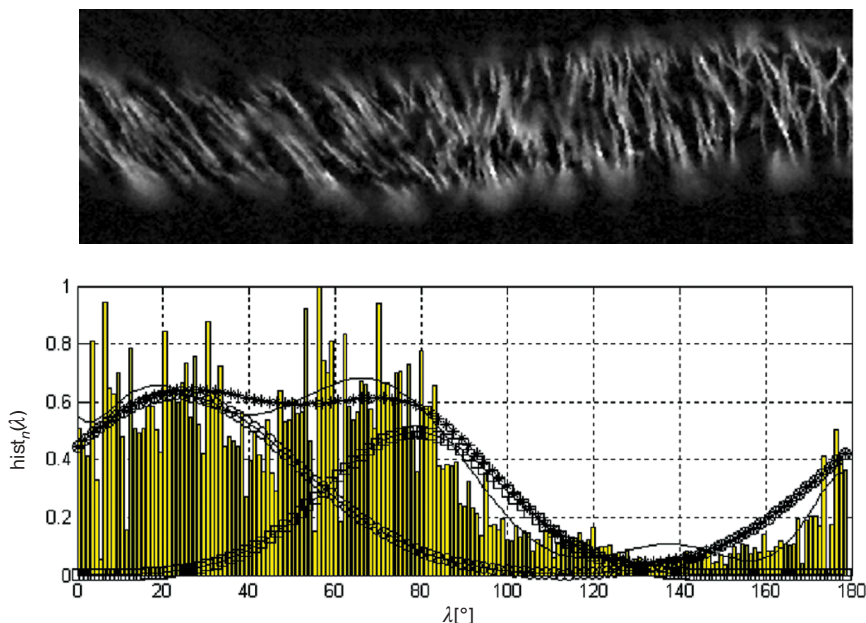
Rys. 5.10. Fragment obrazu  $L_{\text{RGB}}(m, n)$  w poziomach szarości z korektą oświetlenia oraz obraz  $L_{\lambda}(m, n)$ , gdzie każdy piksel jest reprezentowany miarą kątową stopnia nachylenia stycznej w tym punkcie

Na rys. 5.11 zamieszczono histogram obrazu z rys. 5.10.



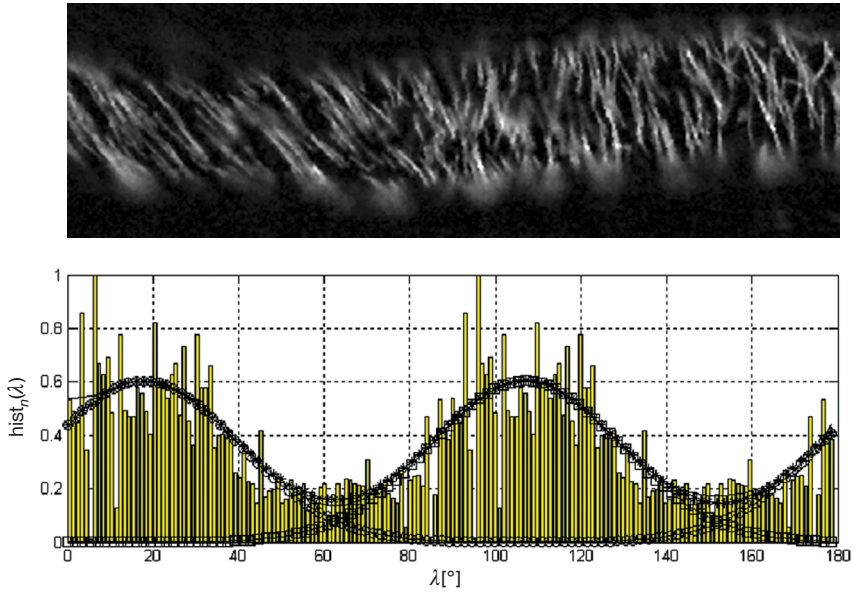
Rys. 5.11. Histogram obrazu z rys. 5.10

Analiza jakościowa obrazów przedstawionych na rys. 5.10 umożliwia ocenę zmian kąta nachylenia, jednak przedstawiony na rys. 5.11 histogram wyraźnie wskazuje, że maksymalne nachylenie wynosi ok.  $120^\circ$ . Tak więc uogólnienie wyniku z obliczeń histogramu dla całego obrazu nie jest celowe i tylko podczas analizy samego histogramu może wprowadzić obserwatora w błąd. Uzasadniona jest zatem potrzeba analizy obszarowej. Na rys. 5.12 przedstawiono trzy różne fragmenty mikrotubul i odpowiadające im histogramy bimodalne  $hist_n$  kąta nachylenia mikrotubul, a także dodatkowo przebiegi  $hist_{*n}$  (przebieg zaznaczony kółkami),  $hist_{*na}$  oraz  $hist_{*nb}$  (przebieg zaznaczony kwadratami).

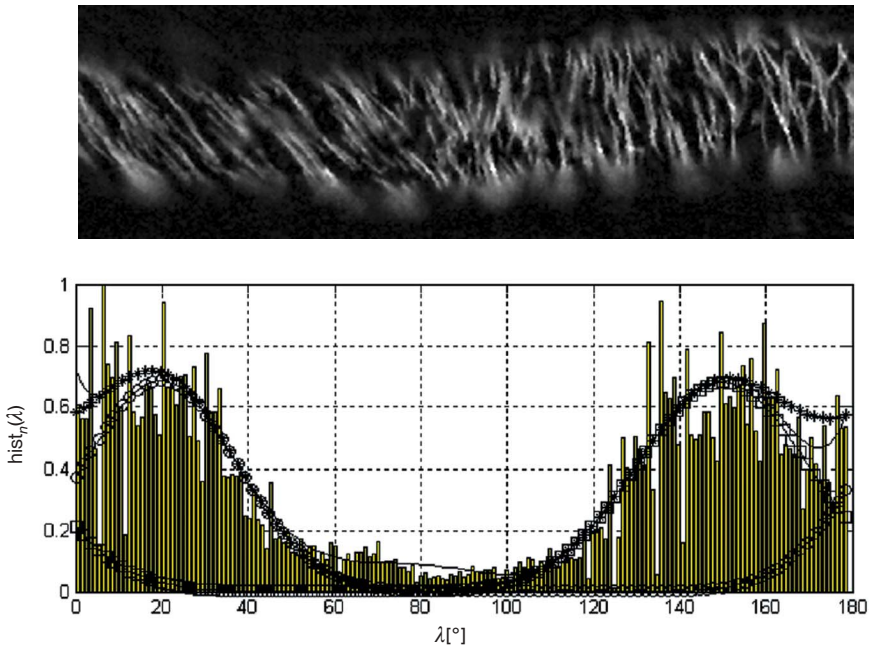


Rys. 5.12. Mikrotubula i odpowiadający jej histogram — parametry histogramu:

$$A_{na} = 0,25, \lambda_a = 22, \sigma_a = 0,16, A_{nb} = 0,15, \lambda_b = 79, \sigma_b = 0,12$$



Rys. 5.13. Mikrotubula i odpowiadający jej histogram — parametry histogramu:  
 $A_{na} = 0,19$ ,  $\lambda_a = 19$ ,  $\sigma_a = 0,12$ ,  $A_{nb} = 0,19$ ,  $\lambda_b = 108$ ,  $\sigma_b = 0,12$



Rys. 5.14. Mikrotubula i odpowiadający jej histogram — parametry histogramu:  
 $A_{na} = 0,17$ ,  $\lambda_a = 20$ ,  $\sigma_a = 0,1$ ,  $A_{nb} = 0,19$ ,  $\lambda_b = 150$ ,  $\sigma_b = 0,11$

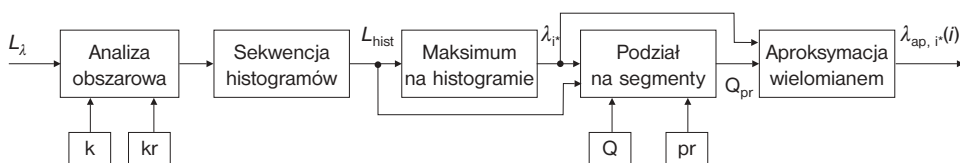
Wartości współczynników  $\lambda_a$ ,  $\lambda_b$ ,  $\sigma_a$ ,  $\sigma_b$  oraz  $A_{na}$  i  $A_{nb}$  dobrano z wykorzystaniem sympleksowej metody optymalizacji, zgodnie z algorytmem Nelder-Meada dla zdefiniowanego błędu w postaci:

$$\delta_h = \sum_{\lambda_n=0}^1 \left| \text{hist}_n(\lambda_n) - \text{hist}_{*n}(\lambda_n, A_{na}, A_{nb}, \sigma_a, \sigma_b) \right|. \quad (5.11)$$

Otrzymane rezultaty zawarto na rys. 5.12. Na tej podstawie można szczegółowo analizować zmiany kąta nachylenia mikrotubul pod wpływem auksyny czy też innych czynników. Istotnym elementem jest dokładność wyznaczenia wartości kątów  $\lambda_{na}$ ,  $\lambda_{nb}$  w obecności szumów w histogramie. Wartość ta jest trudna do analitycznego wyliczenia, ściśle zależy bowiem od kształtu histogramu, kształtu histogramów składowych oraz ich wzajemnej lokalizacji (wartości  $\lambda_{na}$ ,  $\lambda_{nb}$ ,  $\sigma_a$ ,  $\sigma_b$  oraz  $A_{na}$  i  $A_{nb}$ ). Dla wprowadzanych zakłóceń jednostajnych w przedziale  $< -0,2 + 0,2 >$  obliczono błąd w wyznaczeniu kątów  $\lambda_{na}$ ,  $\lambda_{nb}$  na poziomie 10%, a także określono ścisłą zależność od wartości różnicy  $|\lambda_{na} - \lambda_{nb}|$  oraz odchyłeń standardowych  $\sigma_a$ ,  $\sigma_b$ . Przecyzyjna analiza wrażliwości i dokładności wyznaczania wartości kątów  $\lambda_{na}$ ,  $\lambda_{nb}$  przekracza zakres tego podrozdziału i zostanie zaprezentowana w innej pracy.

### 5.3. Podsumowanie

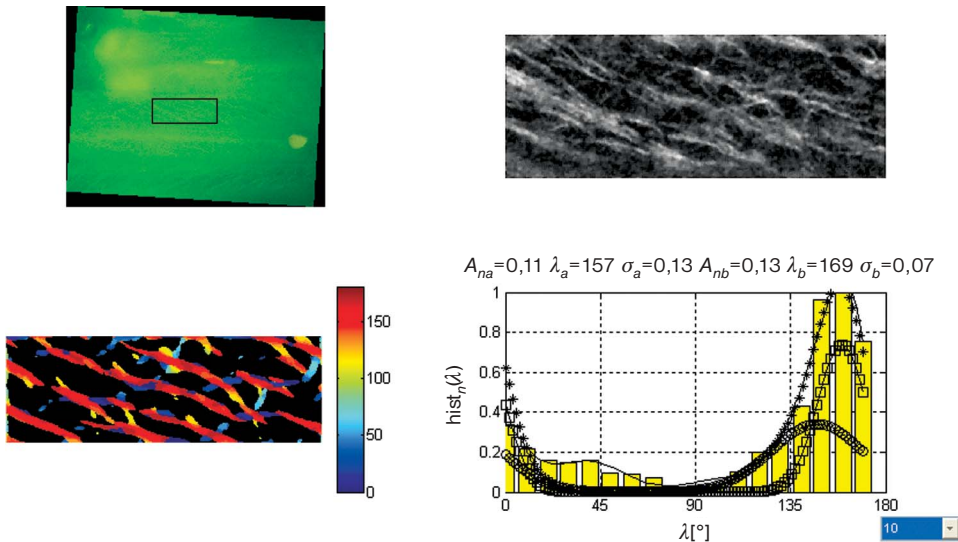
Przedstawiono analizę zmian kąta nachylenia mikrotubul w przyściennym układzie cytoplazmy, analizę, która potwierdziła występowanie brakujących wartości kątowych oraz nieliniowości, co jest związane z naprężeniami, ciśnieniem turgorowym oraz podziałem komórkowym. Stworzony algorytm, którego bloki opisano w pracy, przedstawiono na rys. 5.15.



Rys. 5.15. Schemat blokowy algorytmu analizy zmian stopnia nachylenia mikrotubul

Pokazana w tym rozdziale metodyka postępowania oraz algorytm przetwarzania obrazów mikrotubul znajdują zastosowanie w Katedrze Biofizyki i Biologii Komórki Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Analiza mikrotubul, a dokładniej: obiektów o charakterze podłużnym, ułożonych skrajnie w sposób

losowy, umożliwia rozszerzenie opisywanego rozumowania na obrazy innych klas. Do takich należą np. obrazy termowizyjne ścian budynków, obrazy wszelkiego typu obiektów, w których istotna jest analiza wydłużonych obiektów o dowolnym stosunku szerokości do długości. Główne okno stworzonego oprogramowania przedstawiono na rys. 5.16. Główne okno programu, które analizuje stopień nachylenia mikrotubul, zawiera w pierwszym wierszu: obraz mikrotubul z zaznaczonym obszarem analizy, następnie obszar analizy wybranego fragmentu mikrotubuli po normalizacji i filtracji. W drugim wierszu znajduje się kolorowy obraz fragmentu mikrotubuli, na którym kolor stanowi miarę lokalnego kąta nachylenia danego punktu mikrotubuli oraz histogram mikrotubuli.



Rys. 5.16. Główne okno programu analizującego stopień nachylenia mikrotubul

Stworzone oprogramowanie umożliwia realizację trzech pokazanych na rys. 3.4 podejść, których zestawienie pod względem jakości uzyskiwanych wyników podano w tabeli 5.1.

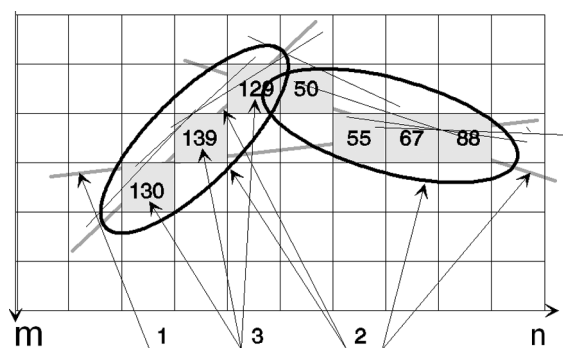
T a b e l a 5.1. Zestawienie własności opisywanych podejść

Wyszczególnienie	Podejście 1-lokalne	Podejście 2-lokalne	Podejście globalne
Zdolność do separacji przecinających się mikrotubul	–	+	+
Selektywność	+	–	–
Dokładność	–	–	+
Histogram	–	–	+



Podjęcie globalne charakteryzuje selektywność i odporność na zakłócenia, co wynika z jego charakteru. Przybliżanie linią prostą mikrotubuli eliminuje szumy (błędne, lokalne wartości kąta nachylenia) oraz jednoznacznie wyodrębnia odosobnione mikrotubule wyróżniające się innym stopniem nachylenia niż pozostałe analizowane. Niestety, w przypadku krzyżowania się mikrotubul nie zostają one wyodrębnione.

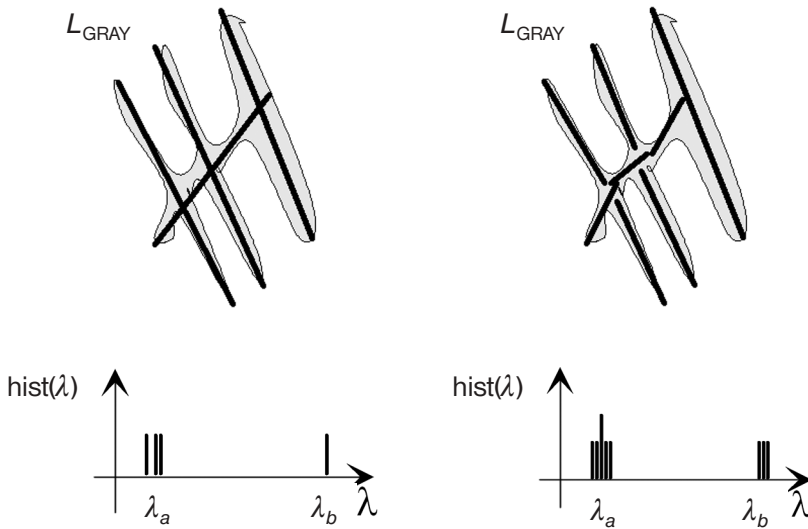
Schemat blokowy porównywanych podejść do obliczania stopnia nachylenia mikrotubul pokazano na rys. 5.17 (rysunek ten był już prezentowany na rys. 3.2, jednak tutaj jego powtórzenie wydaje się celowe), gdzie: 1 — podejście globalne mikrotubuli zostaje przybliżone linią prostą, stanowiącą średnią z nachylenia poszczególnych stycznych do pikseli mikrotubuli, 2 — zmodyfikowane podejście 1, gdzie zbyt duża różnica w kącie nachylenia powoduje przybliżenie mikrotubuli dwoma liniami prostymi, 3 — podejście lokalne, w którym każdy z pikseli mikrotubuli zostaje zastąpiony wartością kąta nachylenia jego stycznej.



Rys. 5.17. Schemat blokowy porównywanych podejść do obliczania stopnia nachylenia mikrotubul

Podział mikrotubuli, w przypadku gdy ma ona liczne wygięcia, na dwie lub więcej części i przybliżanie ich prostymi w sposób nieznaczny eliminują tę wadę. Jednak w tym zmodyfikowanym podejściu maleje selektywność, powstają liczne mikrotubule, których liczba daje fałszywe wyniki dla histogramu.

Na rysunku 5.18 pokazano schemat poglądowy wyjaśniający różnice między wynikami uzyskiwanymi w obliczaniu stopnia nachylenia mikrotubul zgodnie z 1-globalnym podejściem (mikrotubula zostaje przybliżona linią prostą będącą średnią z nachylenia poszczególnych stycznych do pikseli mikrotubuli) a 2-globalnym podejściem.



Rys. 5.18. Schemat poglądowy wyjaśniający różnice w wynikach uzyskiwanych w obliczaniu stopnia nachylenia mikrotubul

Ostatnie, najlepsze, podejście lokalne co prawda nie ma wspomnianej własności selektywności i jawnego wyodrębniania charakterystycznych mikrotubul (w sensie ich kąta nachylenia), jednak jest pozbawiona innych wspomnianych wad.

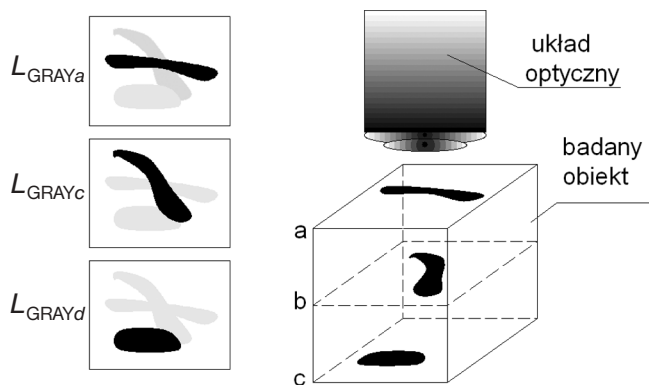
Stworzono komercyjny program analizujący stopień nachylenia mikrotubul kilkoma, opisanymi wcześniej, metodami, wraz z analizą otrzymanych histogramów. W programie, podobnie do rys. 5.16, są widoczne: obraz mikrotubul z zaznaczonym obszarem analizy, obszar analizy po normalizacji, filtracji, obraz wyjściowy kolorowy kąta nachylenia oraz histogram.



## 6. REKONSTRUKCJA MIKROTUBUL NA PODSTAWIE SEKWENCJI ICH OBRAZÓW

### 6.1. Wprowadzenie

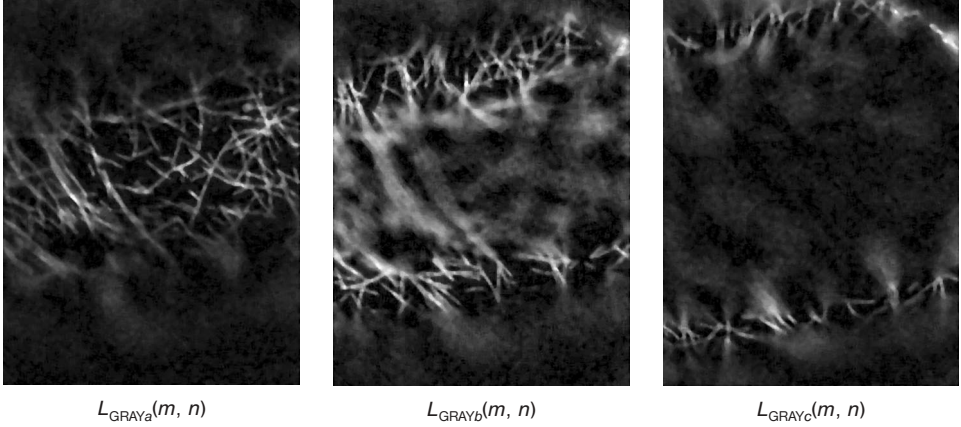
Problematyka trójwymiarowej rekonstrukcji obrazów mikroskopowych zazwyczaj dotyczy obrazów pozyskiwanych z mikroskopów konfokalnych. Jednak korzystając z możliwości zmian głębi ostrości, za pomocą tradycyjnego mikroskopu fluoroscencyjnego można otrzymać sekwencję obrazów dla poszczególnych warstw w głąb preparatu, co pokazano na rys. 6.1.



Rys. 6.1. Schemat poglądowy metody otrzymywania sekwencji obrazów dla różnych głębi ostrości z wykorzystaniem tradycyjnego układu optycznego

Pozyskane obrazy (ze względu chociażby na trudności w uzyskaniu liniowego skoku ostrości) są jedynie zgrubnym przybliżeniem struktury na kolejnych warstwach preparatu. Metodyka ta jednak, głównie ze względu na jej powszechną dostępność (brak konieczności wykorzystywania kosztownego mi-

kroskopu konfokalnego), jest wystarczająca dla większości zastosowań. Przykładowe obrazy  $L_{\text{GRAY}a}(m, n)$ ,  $L_{\text{GRAY}b}(m, n)$ ,  $L_{\text{GRAY}c}(m, n)$  o rozdzielczości  $M \times N = 400 \times 250$  pozyskane dla różnych ustawień głębokości ostrości (zmienianej o stałą wartość) pokazano na rys. 6.2.



Rys. 6.2. Obrazy o rozdzielczości  $M \times N = 400 \times 250$  pozyskane zgodnie z metodyką pokazaną na rys. 6.1

Z prezentowanymi obrazami są związane dwa problemy:

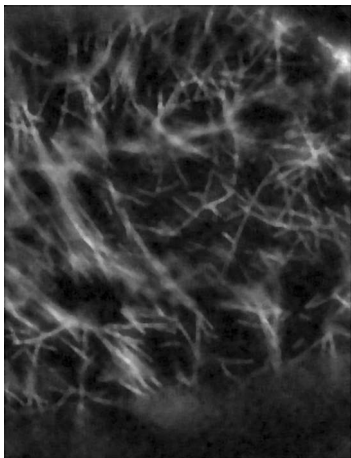
- nałożenie obrazów  $L_{\text{GRAY}a}(m, n)$ ,  $L_{\text{GRAY}b}(m, n)$ ,  $L_{\text{GRAY}c}(m, n)$  w taki sposób, by była widoczna jak największa liczba obiektów na scenie,
- rekonstrukcja trójwymiarowa mikrotubul.

## 6.2. Nakładanie sekwencji obrazów

Pozyskana sekwencja obrazów, przedstawiona na rys. 6.2, nasuwa przypuszczenie, że dodanie wagowe obrazów może przynieść oczekiwane rezultaty, tj.:

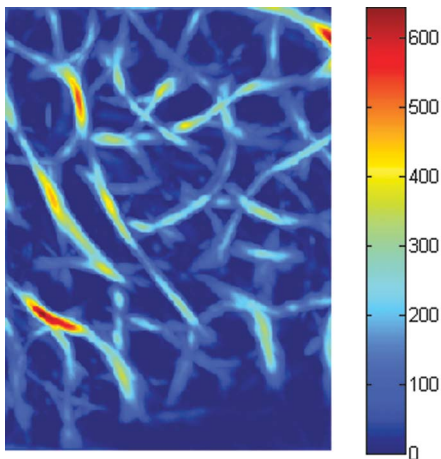
$$L_{\lambda abc}(m, n) = 0,33 \cdot L_{\lambda a}(m, n) + 0,33 \cdot L_{\lambda b}(m, n) + 0,33 \cdot L_{\lambda c}(m, n). \quad (6.1)$$

Wynik w postaci sumy wagowej (z wagą 33%) obrazów przedstawionych na rys. 6.2 nie przynosi jednak tych oczekiwanych rezultatów, co ilustruje rys. 6.3.



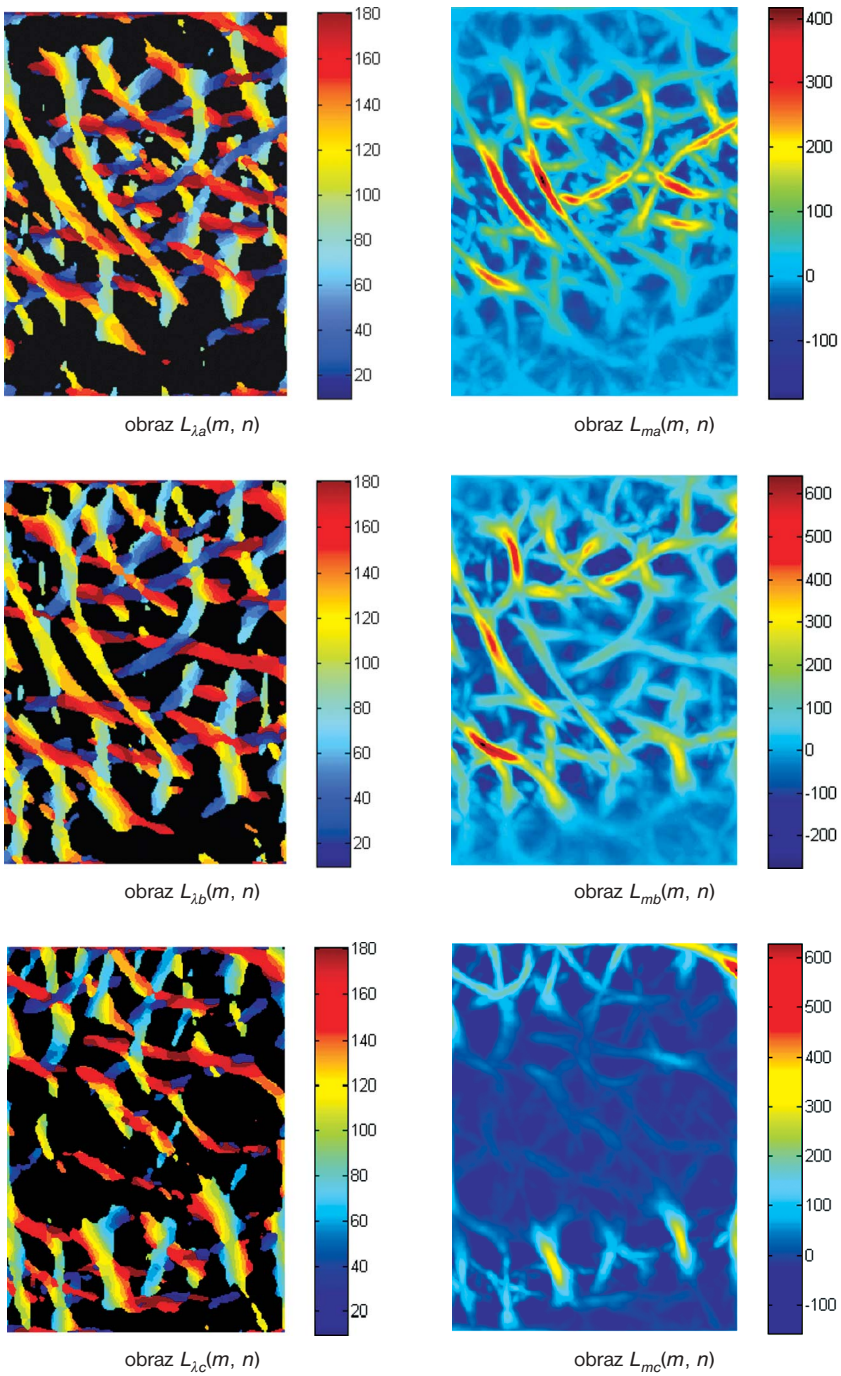
Rys. 6.3 Wynik zsumowania wagowego obrazów  $L_{\text{GRAY}a}(m, n)$ ,  $L_{\text{GRAY}b}(m, n)$ ,  $L_{\text{GRAY}c}(m, n)$  z rys. 6.2

Przedstawione przykładowe obrazy sekwencji potwierdzają przypuszczenie, że wstępnym etapem rekonstrukcji 3D musi być analiza ostrości obiektów, dzięki której można będzie nałożyć obrazy oraz pozyskać jednoznaczne informacje o położeniu obiektu w głębi preparatu.



Rys. 6.4. Maksymalna wartość każdego z pikseli obrazów  $L_{ma}(m, n)$ ,  $L_{mb}(m, n)$ ,  $L_{mc}(m, n)$

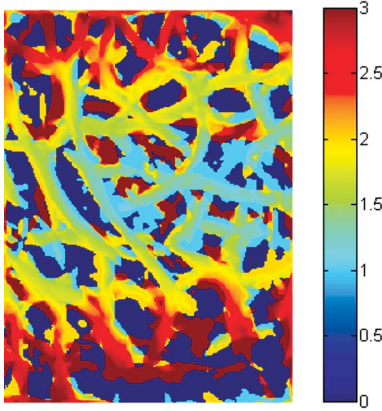
Przeprowadzając analizę stopnia nachylenia układów mikrotubul dla pojedynczego obrazu  $L_{\text{GRAY}}(m, n)$ , w wyniku analizy otrzymuje się pole kierunku, któremu towarzyszą dwie macierze o rozdzielczości  $(M \times N)$  obrazu  $L_{\text{GRAY}}(m, n)$ , tj.:  $L_{\lambda}(m, n)$ ,  $L_m(m, n)$ . Pierwsza z nich, tj.  $L_{\lambda}(m, n)$ , zawiera informacje o kierunku nachylenia mikrotubul, a druga, tj.  $L_m(m, n)$ , o stopniu jego dopasowania (wadze — istotności obliczonego kąta). Metodyka pozyskania obu macierzy została dokładnie opisana wcześniej. Przykładowe obrazy macierzy  $L_{\lambda}(m, n)$ ,  $L_m(m, n)$  przedstawiono na rys. 6.5.



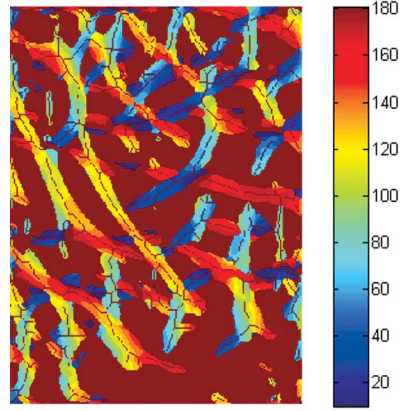
Rys. 6.5. Poszczególne pary obrazów odpowiednio  $L_{\lambda a}(m, n) \Rightarrow L_{ma}(m, n)$ ,  $L_{\lambda b}(m, n) \Rightarrow L_{mb}(m, n)$ ,  $L_{\lambda c}(m, n) \Rightarrow L_{mc}(m, n)$

Otrzymany obraz wyjściowy  $L_{mabc}(m, n)$  (na podstawie  $L_{ma}(m, n)$ ,  $L_{mb}(m, n)$ ,  $L_{mc}(m, n)$ ) pokazano na rys. 6.6. Obraz obliczono, korzystając z zależności:

$$L_{mabc}(m, n) = \max(L_{ma}(m, n), L_{mb}(m, n), L_{lc}(m, n)). \quad (6.2)$$

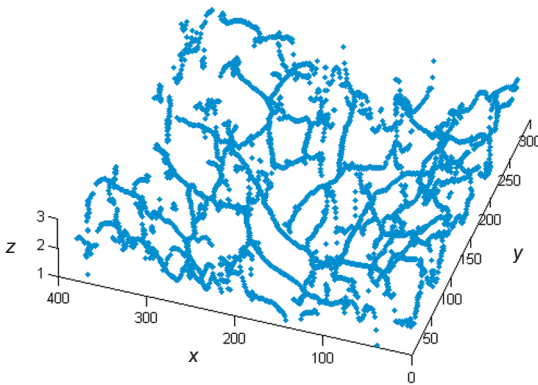


Rys. 6.6. Obraz  $L_{mabc}(m, n)$



Rys. 6.7. Obraz  $L_{\lambda}$  pozyskany dla wartości  $L_{mabc}(m, n)$

Obrazy na rys. 6.6 i 6.7 są „złączeniem” trzech informacji  $L_{\lambda}(m, n)$ ,  $L_m(m, n)$  przedstawionych na rys. 6.5. Obrazują wagę najlepszego dopasowania oraz odpowiadający mu kąt. Po aproksymacji trójwymiarowej otrzymuje się chmurę punktów przybliżających przestrzenne ułożenie mikrotubuli, co ilustruje rys. 6.8.



Rys. 6.8. Wynik aproksymacji trójwymiarowej uzyskiwanej dla sekwencji obrazów z rys. 6.5

$x, y$  — osie wierszy i kolumn obrazu,  
 $z$  — kolejny obraz z sekwencji — głębia ostrości

Dzięki temu możliwa jest rekonstrukcja mikrotubul wydłużonymi obiektami cylindrycznymi (rys. 6.9).

Rys. 6.9. Rekonstrukcja mikrotubul na podstawie rys. 6.8



Przedstawiona w tym rozdziale metodyka rekonstrukcji obrazów mikrotubul znajduje praktyczne zastosowanie w modelowaniu zjawisk zachodzących w komórkach roślinnych, pełni też nieocenioną funkcję w dydaktyce jako materiał ilustrujący. Krytyczne uwagi mogą być tu adresowane do błędów takiej rekonstrukcji, jednak wydają się mniej istotne w przypadku zastosowania opisaney metody tylko w formie materiałów prezentacyjnych.



## 7. POLE KIERUNKU W ANALIZIE OBIEKTÓW CYLINDRYCZNYCH

### 7.1. Wprowadzenie

Pole kierunku w zastosowaniu do obiektów medycznych czy biologicznych umożliwia stworzenie algorytmów będących cennym wkładem w przeprowadzaniu ich segmentacji. Obszarowe, lokalne zmiany stopnia nachylenia analizowanych obiektów stanowią podstawę do dalszych ich analiz i segmentacji oraz rozszerzenia na obiekty o bardziej rozbudowanym kształcie. Takie poszerzone podejście będzie zaprezentowane w niniejszym rozdziale.

Obecnie niezwykle dużo miejsca poświęca się zagadnieniom segmentacji. Świadczą o tym liczne publikacje, w których korzysta się ze znanych metod segmentacji obrazów, rozszerzając je o nowe elementy. Jednym z takich przykładów jest segmentacja obiektów z wykorzystaniem metod detekcji konturu, np. metody węży (*snakes*) [14], lub też modyfikacja tej metody wprowadzeniem pola wektorowego [50]. Niestety, metody te stanowią tylko jeden z wielu etapów detekcji oraz aproksymacji konturów obiektów cylindrycznych, o czym świadczy chociażby artykuł [1]. Znakomicie natomiast sprawdzają się tu algorytmy oparte na tradycyjnej metodzie progowania z modyfikacją polegającą np. na obliczaniu funkcji energii [54]. Dość dobre wyniki uzyskuje się też w rozpoznawaniu obiektów cylindrycznych — twarzy, z wykorzystaniem do sterowania robotami [40], [52], czy też myszką komputera za pomocą ruchów głową [8], [25]. Metody rozpoznawania udostępniają dość dużą grupę narzędzi analizy tego typu obiektów, jednak żadna z wymienionych metod nie opiera się na analizie pola kierunku w prosty sposób, by umożliwić detekcję położenia środka obiektu cylindrycznego, a następnie aproksymację jego konturów. Dodatkowo metody te są profilowane do konkretnych zastosowań, co nie tylko czyni je mniej uniwersalnymi, lecz także ogranicza funkcjonalność zbudowanych aplikacji.

W dalszej części rozdziału zostaną przedstawione fundamentalne zależności zdefiniowanego pola kierunku, a następnie podejście to będzie rozszerzone na obiekty innego typu. Weryfikacja poprawności przyjętej metodyki zostanie przeprowadzona na przykładzie segmentacji tęczęwki oka.

## 7.2. Analiza konturów obiektów cylindrycznych

Analizę obiektów wydłużonych, które mogą być konturem obiektów dowolnego kształtu, szczegółowo omówiono w rozdziałach poprzednich. Obecnie zostaną przedstawione fundamentalne własności, które następnie zostanie rozszerzone dla obiektów dowolnego typu.

W dalszych rozważaniach będzie omówiony obraz wejściowy tylko w poziomach szarości  $L_{\text{GRAY}}(m, n)$  o rozdzielczości  $M \times N$  (gdzie  $M$  — liczba wierszy,  $N$  — liczba kolumn), który zawiera jeden obiekt o charakterze wydłużonym. Przez wydłużony obiekt dalej będzie rozumiany obiekt wypukły, którego stosunek krótszej do dłuższej przekątnej jest nie większy niż  $1/2$ . Wstępnie można założyć, że wydłużonym obiektem będzie kontur np. okręgu. Dla takiego obiektu zostanie przeprowadzona filtracja filtrem medianowym o rozmiarze maski odpowiednio dopasowanym do rozmiaru obiektu (jego rozdzielczości), a następnie proces iteracyjny obliczający splot dla kątów  $\lambda$  z przedziału  $0$ — $180^\circ$ , z wykorzystaniem maski  $h$  splotu o rozdzielczości  $M_h \times N_h$ . Dla  $\lambda = 0^\circ$ ,  $\lambda = 45^\circ$ ,  $\lambda = 90^\circ$  i  $\lambda = 135^\circ$  otrzymano np. wartości w masce przedstawione w (7.1).

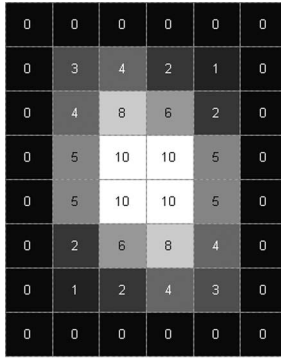
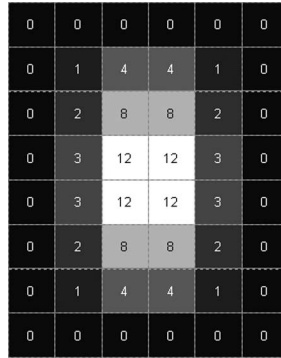
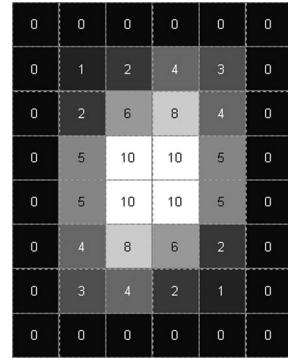
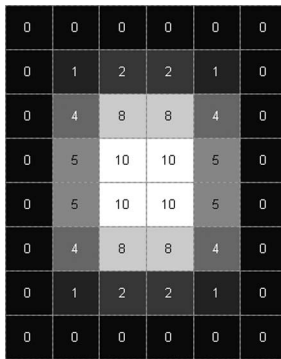
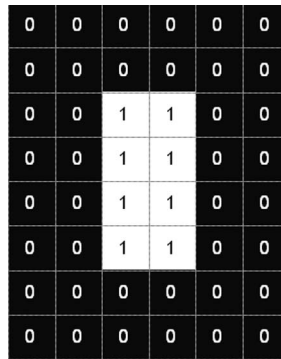
$$\begin{aligned}
 h_{\lambda=0} = h_{\lambda=180} &= \begin{bmatrix} 1 & 3 & 1 \\ 1 & \underline{3} & 1 \\ 1 & 3 & 1 \end{bmatrix} & h_{\lambda=90} = h_{\lambda=270} &= \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 3 & \underline{3} & 3 \\ 1 & 1 & 1 \end{bmatrix}, \\
 h_{\lambda=45} = h_{\lambda=225} &= \begin{bmatrix} 1 & 1 & 3 \\ 1 & \underline{3} & 1 \\ 3 & 3 & 1 \end{bmatrix} & h_{\lambda=135} = h_{\lambda=315} &= \begin{bmatrix} 3 & 1 & 1 \\ 1 & \underline{3} & 1 \\ 1 & 1 & 3 \end{bmatrix}.
 \end{aligned} \tag{7.1}$$

Kolejnym etapem działania algorytmu jest wykonywanie sekwencyjnie splotu z maską  $h_\lambda$  (powstała w wyniku obrotu  $h$  o kąt  $\lambda$ ) dla kątów  $\lambda$  z przedziału  $0$ — $180^\circ$  o zadany krok (np. co  $45^\circ$ ).

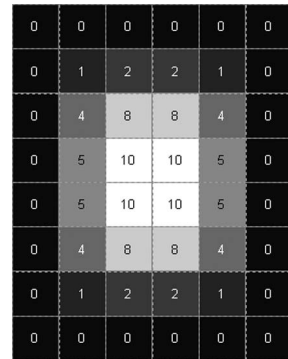
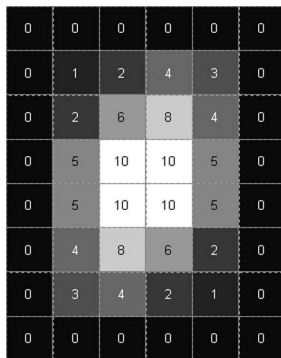
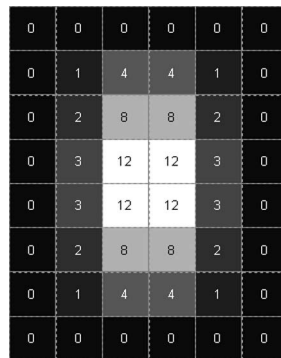
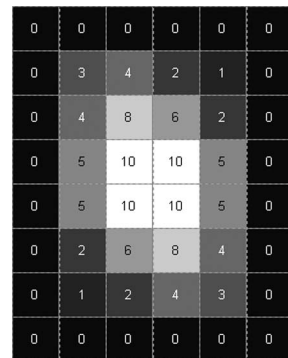
$$L_{\text{GRAY}_h}(m, n, \lambda) = \sum_{m_h=-M_h/2}^{M_h/2} \sum_{n_h=-N_h/2}^{N_h/2} L_{\text{GRAY}}(m + m_h, n + n_h) \cdot h_\lambda(m_h, n_h). \tag{7.2}$$



Utworzone zgodnie z zależnością (7.2) obrazy pokazano na rys. 7.1. Należy zwrócić uwagę na przyjętą kolejność prezentacji poszczególnych masek.

 $\lambda = 45^\circ$  $\lambda = 90^\circ$  $\lambda = 135^\circ$  $\lambda = 0^\circ$ 

obraz wejściowy

 $\lambda = 180^\circ$  $\lambda = 315^\circ$  $\lambda = 270^\circ$  $\lambda = 225^\circ$ 

Rys. 7.1. Wyniki splotu obrazu  $L_{\text{GRAY}_h}(m, n, h)$  dla kolejnych kątów masek

Następnie oblicza się wartość maksymalną dla każdego z pikseli powstałych obrazów  $L_{GRAY\_h}(m, n, h)$  oraz zapamiętywana jest informacja, dla jakiego  $h$ , czyli przy jakim  $\lambda$ , była obliczona, tj.:

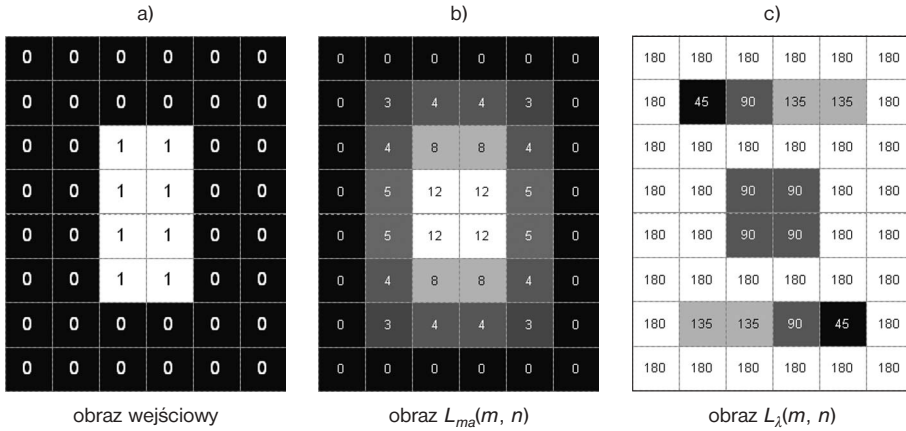
$$L_{ma}(m, n) = \max_{\lambda \in (0, 180)} (L_{GRAY\_h}(m, n, \lambda)). \quad (7.3)$$

Utworzony na tej podstawie obraz  $L_{ma}(m, n)$  pokazano na rys. 7.1. Obraz  $L_{\lambda}(m, n)$  jest obrazem o rozdzielności obrazu  $L_{ma}(m, n)$  z wartościami kąta  $\lambda$ , dla którego osiągnięto maksimum, tj.:

$$L_{\lambda}(m, n) = \begin{cases} \lambda & \text{dla } L_{GRAY\_h}(m, n, \lambda) = L_{ma}(m, n), \\ L_{\lambda}(m, n) & \text{dla } L_{GRAY\_h}(m, n, \lambda) \neq L_{ma}(m, n), \end{cases} \quad (7.4)$$

dla  $\lambda \in (0, 180)$ .

Uzyskane obrazy  $L_{\lambda}(m, n)$ ,  $L_{ma}(m, n)$  oraz pośrednie etapy  $L_{GRAY\_h}(m, n)$  pokazano na rys. 7.2.



Rys. 7.2. Kolejne etapy działania algorytmu

Kluczowym elementem do dalszych obliczeń są wartości katowe otrzymane w  $L_{\lambda}(m, n)$ . Jak wynika z rys. 7.3 c, wartości te, zgodnie z możliwymi kątami obrotu maski  $h$ , pochodzą ze zbioru  $\{0^\circ, 45^\circ, 90^\circ, 135^\circ\}$ . W praktyce zwiększenie rozdzielczości pomiaru kąta wiąże się ze zwiększeniem liczby iteracji, czyli zmniejszeniem wartości kroku dla zmieniających się wartości katowych  $\lambda$ . Dalej zaproponowano metodę aproksymacji brakujących wartości katowych, wykorzystując zależności:

$$L_{\text{GRAY}_h^*}(m, n, \lambda) = L_{\text{GRAY}_h}(m, n, \lambda) / L_{\text{GRAY}_h\_SUM}(m, n), \quad (7.5)$$

gdzie:

$$L_{\text{GRAY}_h\_SUM}(m, n) = \sum_{\lambda=0}^{180} L_{\text{GRAY}_h}(m, n, \lambda). \quad (7.6)$$

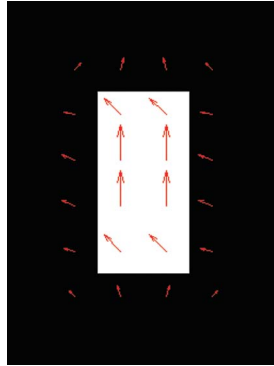
Zmodyfikowane wartości kątowe obrazu  $L_{\lambda m}(m, n)$  w stosunku do  $L_{\lambda}(m, n)$  wynoszą:

$$L_{\lambda m}(m, n) = \sum_{\lambda=0}^{180} L_{\text{GRAY}_h^*}(m, n, \lambda) \cdot \lambda. \quad (7.7)$$

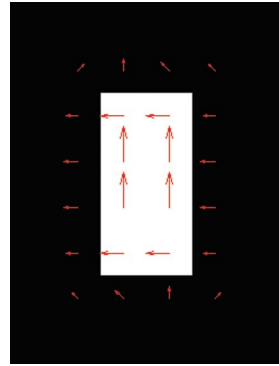
Otrzymany obraz pola nachylenia  $L_{\lambda m}(m, n)$  przedstawiono na rys. 7.3.

180	180	180	180	180	180
180	45	75	105	135	180
180	165	135	135	165	180
180	158	90	90	158	180
180	158	90	90	158	180
180	165	135	135	165	180
180	135	105	75	45	180
180	180	180	180	180	180

$L_{\lambda m}(m, n)$  zmodyfikowany  
w stosunku do  $L_{\lambda}(m, n)$ ,



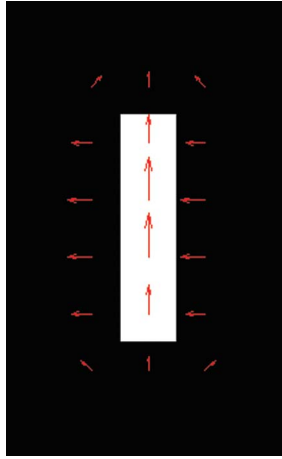
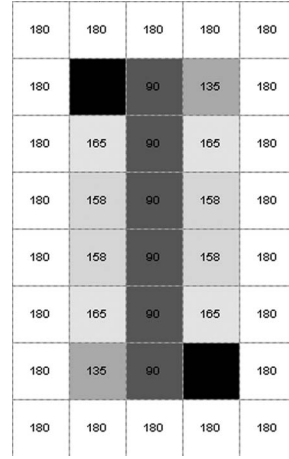
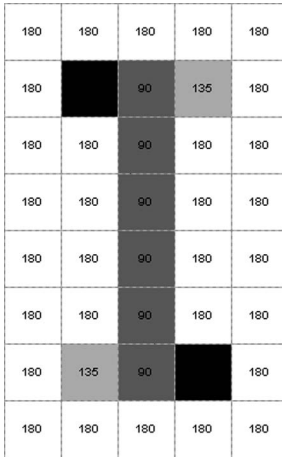
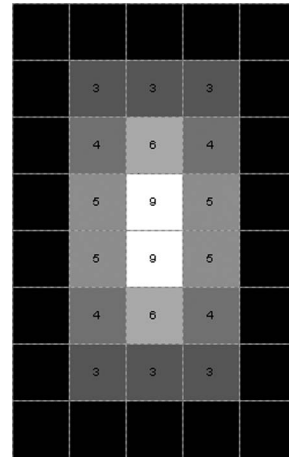
pole kierunku  $L_{\lambda m}(m, n)$  naniesione na obraz wejściowy  $L(m, n)$ ,



pole kierunku  $L_{\lambda}(m, n)$  naniesione na obraz wejściowy  $L(m, n)$

Rys. 7.3. Pole nachylenia  $L_{\lambda m}(m, n)$

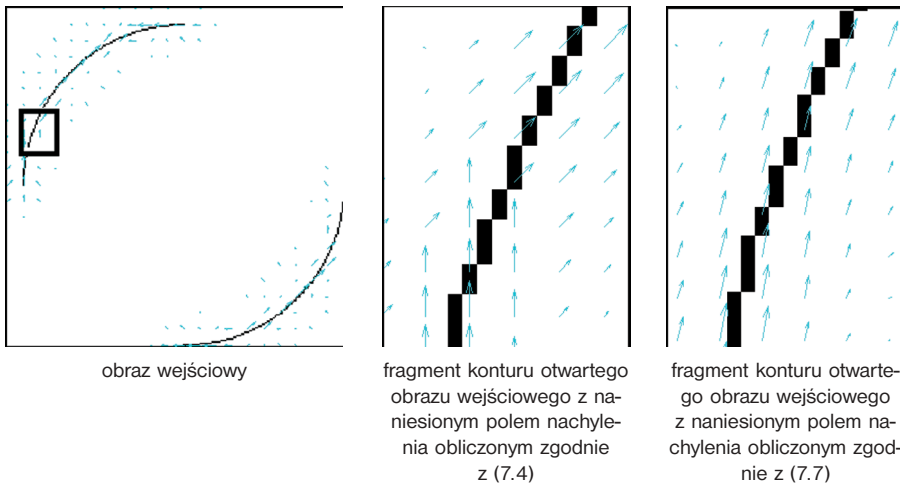
Widoczny brak symetrii pola nachylenia wynika z postaci zależności (7.4), dla której w przypadku maksimum znalezione dla więcej niż jednego kąta  $\lambda$  wynik zależy od kolejności zadawania  $\lambda$ . Niedogodność tę wyeliminowano, obliczając w przypadku występowania podobnej sytuacji medianę ze wskazujących wartości kątowych.

pole kierunku  $L_\lambda(m, n)$  $L_{\lambda m}(m, n)$  $L_\lambda(m, n)$  $L_{ma}(m, n)$ Rys. 7.4. Obrazy kolejno: pole kierunku  $L_\lambda(m, n)$ ,  $L_{\lambda m}(m, n)$ ,  $L_\lambda(m, n)$  i  $L_{ma}(m, n)$ 

W kolejnym rozdziale zostanie przedstawione uogólnienie prezentowanej metody na dowolne obiekty o konturze zamkniętym i otwartym.

### 7.3. Analiza obiektów cylindrycznych

Do obiektów o charakterze cylindrycznym należą, zgodnie z definicją, wszystkie te obiekty, których kształt konturu nie jest linią prostą i które mają co najmniej jedno ognisko. Dodatkowo zakłada się, że obiekty te mogą mieć zarówno otwarty, jak i zamknięty kontur. Na rys. 7.5 pokazano klasyczny przykład, w którym kontur (obraz binarny) nie jest zamknięty.



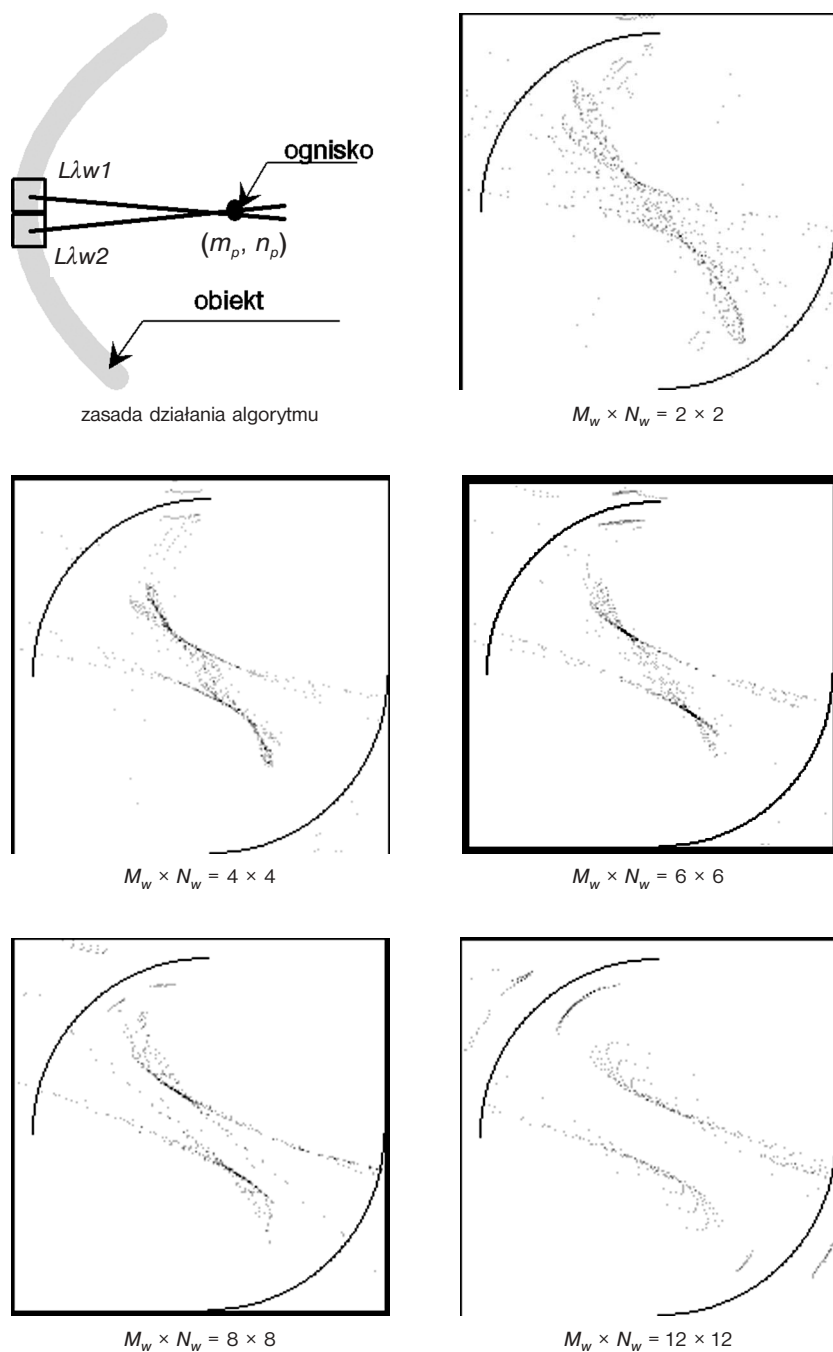
Rys. 7.5. Schemat poglądowy działania algorytmu (ze względu na lepszą czytelność obrazy pokazano w negatywie)

Celem dalszych rozważań na ten temat jest określenie algorytmu wykorzystującego pole nachylenia, którego działanie połączyłoby kontur, tworząc obiekt zamknięty.

#### 7.3.1. Wyznaczenie obszaru poddawanego analizie

Na podstawie literatury [4], [12] oraz wstępnie przeprowadzonych doświadczeń okazuje się, że dającą poprawne rezultaty metodą jest metoda wyznaczania ogniska obiektu złożonego. W tym celu niezbędne jest określenie współrzędnych pikseli obiektu przeznaczonych do wyznaczania przybliżonego położenia ogniska.

Przeprowadzono wstępną analizę, której celem było wyodrębnianie w każdej iteracji fragmentów obrazu  $L_\lambda(m, n)$  i obliczenie dla każdego z nich mediany.



Rys. 7.6. Poglądowy schemat zasady działania algorytmu oraz wyniki uzyskiwane dla różnych wartości parametru  $M_w \times N_w$  (ze względu na lepszą czytelność obrazy pokazano w negatywie)

Na rys. 7.6 a przedstawiono poglądowy schemat ilustrujący zasadę działania algorytmu dla wyznaczonych obszarów  $L_{\lambda w1}(m, n)$  i  $L_{\lambda w2}(m, n)$  o rozdzielczości  $M_w \times N_w$  (zarówno dla jednego, jak i drugiego obszaru):

$$\begin{aligned} L_{\lambda w1}(m, n) &= L_{\lambda}((m - 2 \cdot M_w + 1):m, (n - N_w + 1):(n + N_w)), \\ L_{\lambda w2}(m, n) &= L_{\lambda}((m + 1):(m + 2 \cdot M_w), (n - N_w + 1):(n + N_w)). \end{aligned} \quad (7.8)$$

Położenie obszarów  $L_{\lambda w1}(m, n)$  i  $L_{\lambda w2}(m, n)$  dobrano arbitralnie. Do dalszych obliczeń wykorzystano wartości mediany w analizowanych polach nachylenia  $L_{\lambda w1}(m, n)$  i  $L_{\lambda w2}(m, n)$ , tj.:

$$\lambda_{w1} = \text{med.}_{m, n \in L_{\lambda w1}}(L_{\lambda w1}(m, n)) \quad \lambda_{w2} = \text{med.}_{m, n \in L_{\lambda w2}}(L_{\lambda w2}(m, n)), \quad (7.9)$$

gdzie:

med. — mediana.

Na kolejnym etapie wyznaczania ogniska obliczono równanie kierunkowe prostych, widocznych na rys. 7.6:

$$n_1 = k_1 \cdot (m - m_{0,1}) + n_{0,1} \quad n_2 = k_2 \cdot (m - m_{0,2}) + n_{0,2}, \quad (7.10)$$

gdzie:

$k_1$  i  $k_2$  — odpowiednio  $\text{tg}(\lambda_{w1})$  oraz  $\text{tg}(\lambda_{w2})$ ;  
 $m_{0,1}$ ,  $n_{0,1}$  — punkty środków obszarów  $L_{\lambda w1}(m, n)$ ;  
 $m_{0,2}$ ,  $n_{0,2}$  — punkty środków obszarów  $L_{\lambda w2}(m, n)$ .

$$m_{0,1} = m - M_w \quad m_{0,2} = m + M_w \quad n_{0,1} = n_{0,2} = n. \quad (7.11)$$

Punkt  $(m_p, n_p)$  przecięcia się prostych  $n_1$  i  $n_2$  otrzymuje się, rozwiązując układ równań:

$$\begin{cases} k_1 \cdot (m_p - m_{0,1}) + n_{0,1} = k_2 \cdot (m_p - m_{0,2}) + n_{0,2}, \\ k_2 \cdot (n_p - k_1 \cdot m_{0,1} - n_{0,1}) = k_1 \cdot (n_p - k_2 \cdot m_{0,2} - n_{0,2}). \end{cases} \quad (7.12)$$

Po obliczeniu  $(m, n)$  otrzymuje się:

$$\begin{cases} m_p = \frac{k_1 \cdot k_2 \cdot n_{0,2} - k_1 \cdot m_{0,2} - k_1 \cdot k_2 \cdot n_{0,1} + k_2 \cdot m_{0,1}}{k_2 - k_1}, \\ n_p = \frac{k_1 \cdot n_{0,1} - m_{0,1} - k_2 \cdot n_{0,2} + m_{0,2}}{k_1 - k_2}. \end{cases} \quad (7.13)$$

Uzależniając od  $(m, n)$ , dla których przeprowadzane są bieżące obliczenia, otrzymuje się:

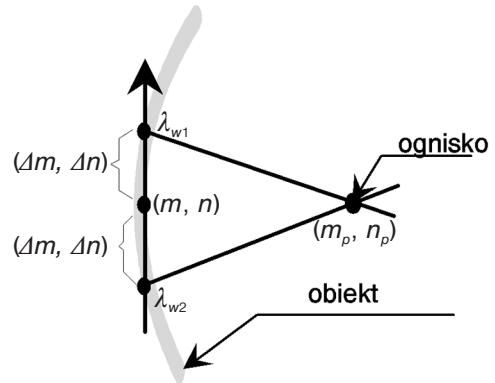
$$\begin{cases} m_p = m - \frac{M_w \cdot (k_2 + k_1)}{k_2 - k_1}, \\ n_p = n + \frac{2 \cdot M_w}{k_1 - k_2}. \end{cases} \quad (7.14)$$

Na tej podstawie dla kolejnych wartości przesunięcia  $(m, n)$  analizowanych fragmentów pól nachylenia  $L_{\lambda_{w1}}(m, n)$  i  $L_{\lambda_{w2}}(m, n)$  tworzy się obraz  $L_p(m, n)$  zawierający (początkowo dla pierwszej iteracji we wszystkich pikselach „0”) informacje o położeniu ognisk dla kolejnych iteracji w następujący sposób:

$$L_p(m, n) = L_p(m, n) + 1 \quad \text{dla} \quad m = m_p, n = n_p. \quad (7.15)$$

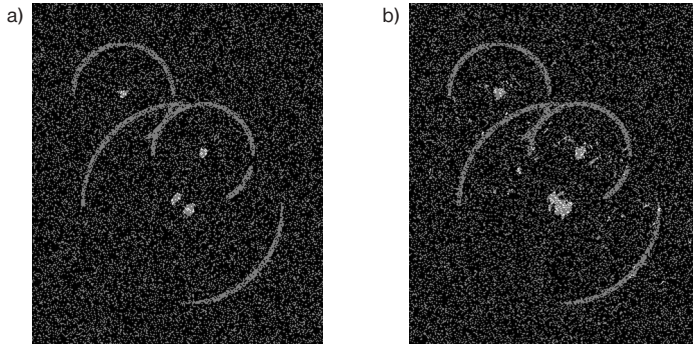
Na rys. 7.6 przedstawiono rezultaty otrzymywane dla różnych wartości  $M_w \times N_w$ . Pomimo utworzonego obrazu fragmentarycznego konturu okręgu dla stałego promienia automat znalazł dwa ogniska.

Tak więc otrzymane rezultaty nie są zadowalające. Przyczyną znacznych błędów w określaniu położenia ogniska (środką okręgu) jest sposób wyliczania wartości  $\lambda_{w1}(m, n)$  i  $\lambda_{w2}(m, n)$ . Metody oceny tych wartości na podstawie obszarów o rozmiarze kwadratowym uzależniają wyniki od aktualnie analizowanego kształtu obiektu (arbitralnie przyjęte obszary zgodnie z (7.11)). Dużo bardziej uniwersalnym podejściem, znacznie polepszającym jakość uzyskiwanych wyników, jest metodyka przedstawiona na rys. 7.8 a.



Rys. 7.7. Zasada działania zmodyfikowanej metody obliczania punktów  $\lambda_{w1}(m, n)$  i  $\lambda_{w2}(m, n)$





Rys. 7.8. Wyniki otrzymywane dla zmodyfikowanej metody obliczania punktów  $\lambda_{w1}(m, n)$  i  $\lambda_{w2}(m, n)$   
(Punkty ogniska zaznaczono białymi pikselami)

Zgodnie z rys. 7.7, wartości  $\lambda_{w1}(m, n)$  i  $\lambda_{w2}(m, n)$  są wartościami pola nachylenia w punktach na prostej odległych o  $(\Delta m, \Delta n)$  od analizowanego punktu  $(m, n)$  o nachyleniu  $L\lambda(m, n)$ , tj.:

$$\lambda_{w1}(m, n) = L_{\lambda}(m - \Delta m, n + \Delta n), \quad (7.16)$$

$$\lambda_{w2}(m, n) = L_{\lambda}(m + \Delta m, n - \Delta n), \quad (7.17)$$

gdzie:

$$\Delta m = A_m \cdot \sin(L_{\lambda}(m, n)), \quad (7.18)$$

$$\Delta n = A_m \cdot \cos(L_{\lambda}(m, n)), \quad (7.19)$$

gdzie:

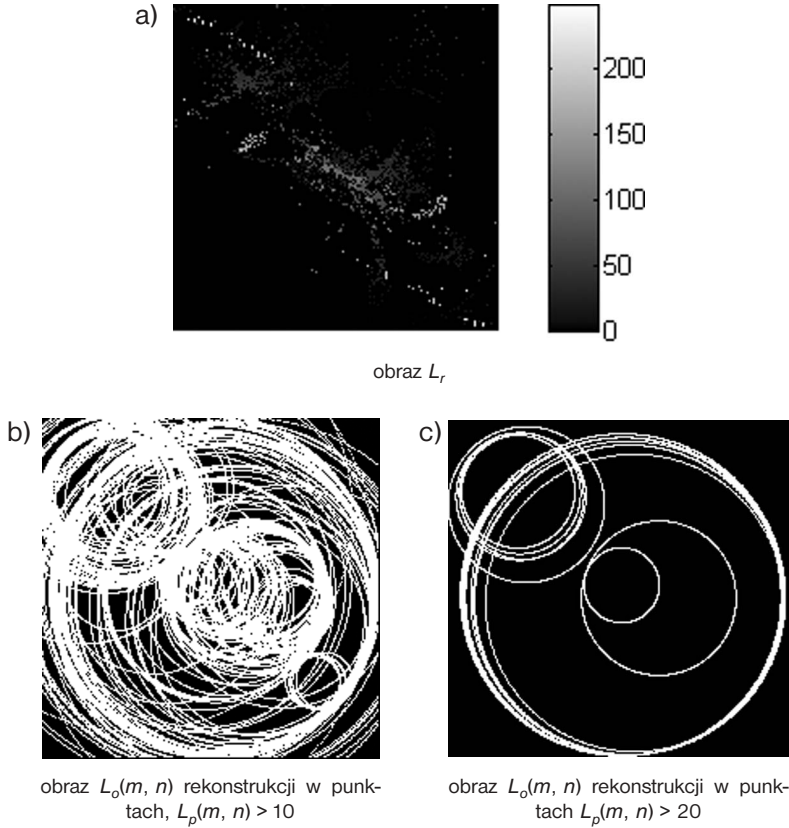
$A_m$  — amplituda.

Znak minus w przedstawionych zależnościach (7.16) i (7.17) wynika z przyjętego układu współrzędnych kolejności wierszy w stosunku do osi „ $\circ Y$ ” w kartezjańskim układzie współrzędnych.

Uzyskane wyniki są zadowalające, co przedstawiono na rys. 7.8, a dobór wartości  $A_m$  zostanie omówiony w kolejnym podrozdziale. Na podstawie obrazu  $L_p(m_p, n_p)$  zatem można zrealizować próbę rekonstrukcji konturu.

### 7.3.2. Rekonstrukcja konturu obiektu cylindrycznego

Przedstawiona literatura [4], [12], [29], [51] niejednokrotnie opisuje możliwość rekonstrukcji obiektów o kształcie cylindrycznym w obecności silnych zakłóceń. Żadna z opisanych metod nie została przeprowadzona dla pola nachylenia, z wyjątkiem [4] opisującej inne niż prezentowane tu rozwiązanie.



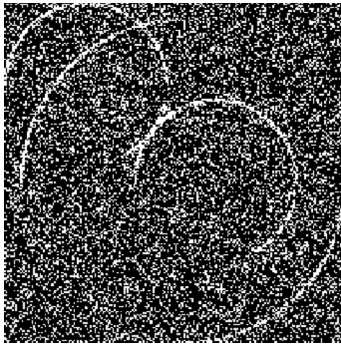
Rys. 7.9. Obrazy  $L_o$  uzyskane dla  $M_w \times N_w = 2 \times 2$

Obraz  $L_p(m, n)$  zawierający informacje o punktach przecięcia się stycznych do poszczególnych elementów pola nachylenia określają prawdopodobne miejsca położenia ognisk kształtów cylindrycznych. Jak widać z przykładów na rys. 7.9, miejsca te nie są zidentyfikowane jednoznacznie, a ich jasność zależy od własności pola nachylenia oraz od rozmiaru  $M_w \times N_w$ .

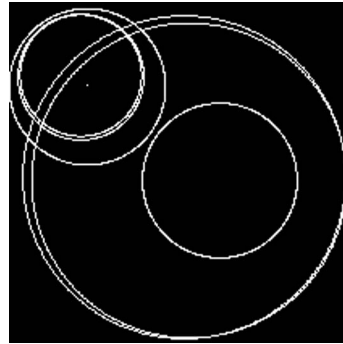
Obraz wartości promienia obliczono z wykorzystaniem przedstawionych zależności (7.11), (7.14) w postaci:

$$L_r(m_p, n_p) = \sqrt{(m - m_p)^2 + (n - n_p)^2}. \quad (7.20)$$

Uzyskany obraz  $L_r(m_p, n_p)$  zaprezentowano na rys. 7.9 a. Uzyskane rezultaty: zgrubne położenie ogniska (obraz  $L_p(m, n)$ ) oraz odpowiadający mu promień zapisany w  $L_r(m_p, n_p)$  pozwalają na rekonstrukcję obiektu. Wstępne wyniki rekonstrukcji uzyskane w punktach  $L_p(m, n) > 10$  pokazano na rys. 7.9 b, a dla  $L_p(m, n) > 20$  uwidoczniono na rys. 7.9 c. Jak widać z otrzymanych rezultatów, korekty wymaga zarówno obraz  $L_r(m_p, n_p)$ , jak i  $L_p(m, n)$  ze względu na błędnie zrekonstruowane okręgi oraz ich fluktuacje wokół prawidłowego położenia (por. rys. 7.9 c). Rekonstrukcja obrazu  $L_o(m, n)$ , utworzone okręgi na rys. 7.9 b i rys. 7.9 c zostały dla promienia odczytanego z  $L_r(m_p, n_p)$  oraz położenia środka okręgu — położenia wartości 1 w binarnym obrazie powstałym z progowania  $L_p(m, n)$ . Korekta i polepszenie uzyskanych wyników wiąże się z przeprowadzeniem obróbki wspomnianego obrazu binarnego i wykorzystaniem np. operacji wyznaczania odległości euklidesowej dla każdego z pikseli, zgodnie z opisem (rys. 7.10).



obraz wejściowy  $L_{\text{GRAY}}(m, n)$  silnie zaszumiony



obraz  $L_o(m, n)$  po rekonstrukcji

Rys. 7.10. Obraz wejściowy  $L_{\text{GRAY}}(m, n)$  silnie zaszumiony oraz odpowiadający mu obraz  $L_o(m, n)$  uzyskany dla  $Mw \times Nw = 2 \times 2$

Zgodnie z (7.15), obraz  $L_p(m, n)$  zawiera informacje o położeniu ognisk jako miejsc przecięcia się prostych prostopadłych do analizowanych obszarów pola nachylenia. Modyfikacją tego sposobu otrzymywania pola nachylenia jest algorytm przedstawiony zależnościami (7.3), (7.4), w wyniku którego otrzymuje się pole nachylenia jako kąt nachylenia wektora w danym punkcie pola oraz jego moduł jako istotność danej w ujęciu globalnym. Z zależności (7.20) otrzymuje się dodatkowo  $L_r(m_p, n_p)$  — wartości promieni dla każdego z ognisk. Obraz  $L_p(m, n)$  jest na ogół zaszumiony zaokrągleniami obliczeń widocznymi w posta-

ci rozmycia położenia ogniska dla każdego z widocznych okręgów. Dlatego też obraz ten wymaga korekty położenia znaczonych ognisk. Jedną z możliwości jest obliczenie odległości między pikselami o wartościach 1 i 0. W tym celu niezbędne jest przeprowadzenie binaryzacji z górnym progiem obrazu  $L_p(m, n)$ , a następnie obliczenie odległości. Obrazem wejściowym zatem jest obraz binarny, natomiast odległość oblicza się między każdym pikselem o wartości 1 a pikselami o wartości 0. W wyniku otrzymuje się macierz o rozmiarach obrazu wejściowego, gdzie miejsce pikseli o wartości 0 są wypełnione wartościami odległości między danym pikselem a najbliższym pikselem o wartości 1. Zastosowane w tym przypadku miary odległości między pikselami o współrzędnych  $L_1(m_1, n_1)$  i  $L_2(m_2, n_2)$  są następujące:

*Euclidean* (euklidesowe):

$$\sqrt{(m_1 - m_2)^2 + (n_1 - n_2)^2}, \quad (7.21)$$

*quasi-euclidean*:

$$\begin{cases} |m_1 - m_2| + (\sqrt{2} - 1)|n_1 - n_2|, & \text{dla } |m_1 - m_2| > |n_1 - n_2| \\ (\sqrt{2} - 1)|m_1 - m_2| + |n_1 - n_2|, & \text{dla } |m_1 - m_2| \leq |n_1 - n_2| \end{cases}, \quad (7.22)$$

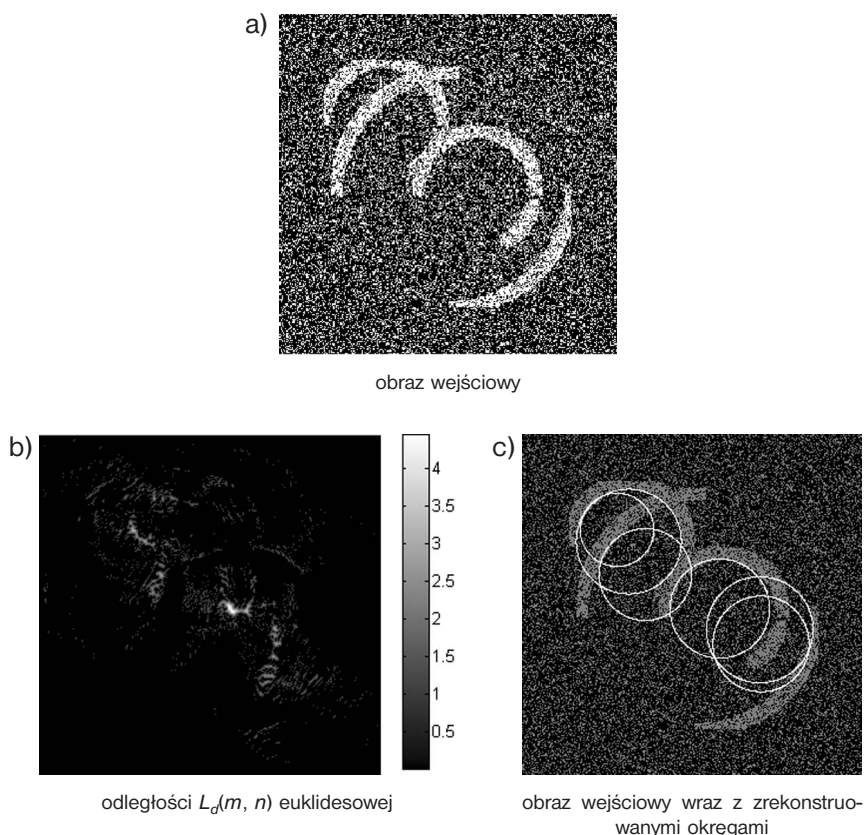
*chessboard* (szachowe):

$$\max(|m_1 - m_2|, |n_1 - n_2|), \quad (7.23)$$

*city block* (absolutne):

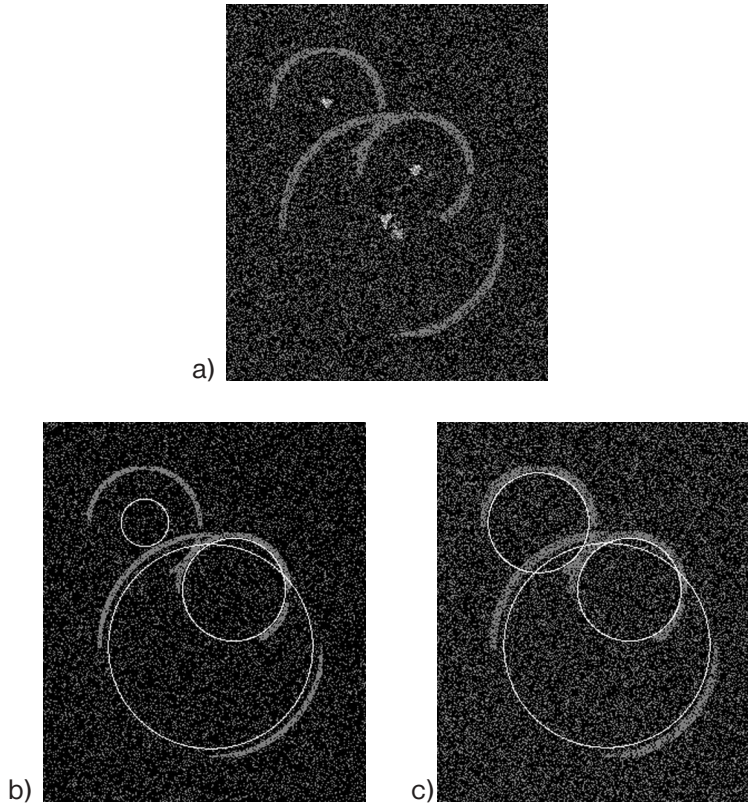
$$|m_1 - m_2| + |n_1 - n_2|. \quad (7.24)$$

W wyniku otrzymuje się obraz odległości  $L_d$  przedstawiony na rys. 7.11.



Rys. 7.11. Obraz wejściowy oraz jego rekonstrukcja

Na rys. 7.11 c widać okręgi, które nie są całkowicie zgodne z treścią obrazu wejściowego. Funkcja obliczania odległości między pikselami binarnego obrazu wejściowego niestety globalizuje również te piksele położenia środków, które zostały pozyskane dla różnych wartości promieni. Dlatego też ostatnim niezbędnym zabiegiem jest erozja warunkowa obrazu  $L_d(m, n)$ , z uwzględnieniem obrazu  $L_r(m_p, n_p)$ . Podstawowe zależności oraz własności operacji erozji i dylatacji warunkowej zostały szczegółowo opisane w [16] i [17], a obecnie zostaną przedstawione tylko otrzymane rezultaty.



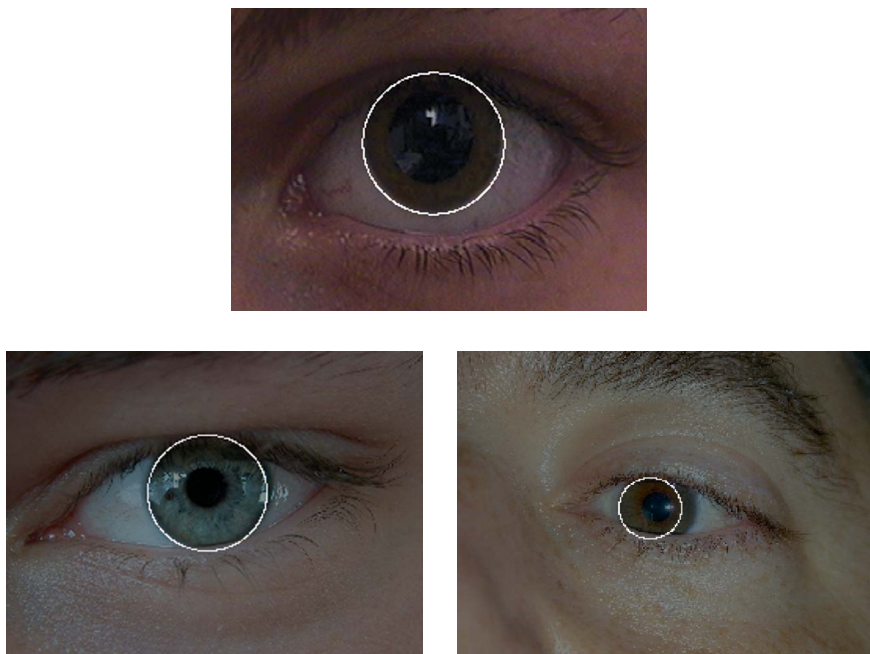
Rys. 7.12. Rekonstrukcja okręgów przeprowadzona dla różnych obrazów wejściowych o różnym poziomie szumów

a) obraz wejściowy oraz obraz  $L_p(m_p, n_p)$ ; b) i c) przykładowe obrazy po rekonstrukcji okręgów (obraz wejściowy  $L_{\text{GRAY}}(m, n)$  — 50% nasycenia, oraz obraz wyjściowy  $L_o(m, n)$  — również 50% nasycenia)

## 7.4. Przykładowe zastosowanie

Jednym z obszarów zastosowania opisywanej metody rekonstrukcji jest okulistyka w medycynie. Interesujące z punktu widzenia lekarza są obszary wewnątrz tęczówki, z możliwością ich automatycznej separacji. Zagadnienie to wielokrotnie analizuje się np. w irydologii, w której kluczowy element stanowi dokładne nałożenie rastru na tęczówkę. Wyniki tej metody są przedstawione na rys. 7.13.





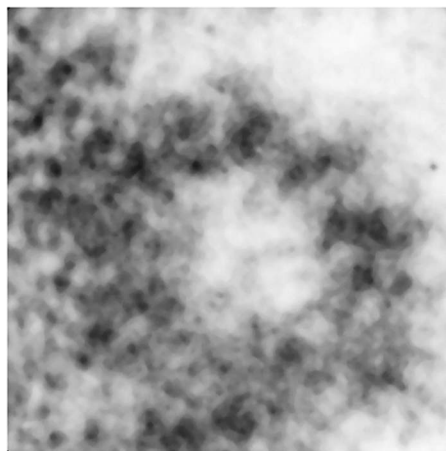
Rys. 7.13. Przykłady zastosowania metody rekonstrukcji okręgów przeprowadzonych dla różnych położeń obiektu cylindrycznego

Opisana metoda okazuje się niezwykle przydatna w znajdowaniu konturu tęczówki oka, który jest niezbędny w określaniu charakterystycznych obszarów, np. w okulistyce. Otrzymane rezultaty prezentowane na rys. 7.13 są tylko przykładem zastosowania pola nachylenia. W zależności od wymaganej dokładności można prowadzić dalsze rozważania dotyczące wykrywania czy też rekonstrukcji obiektów o innych bardziej złożonych kształtach.

## 8. ANALIZA OKRESOWOŚCI PROTOFILAMENTÓW W POPRZECZNYM OBRAZIE MIKROTUBULI

### 8.1. Wprowadzenie

Każda mikrotubula składa się z protofilamentów, które można zobaczyć w poprzecznym obrazie pojedynczej mikrotubuli, co pokazano na rys. 8.1, korzystając z wyników autorów pracy [21].



Rys. 8.1. Obraz protofilamentów w poprzecznej strukturze mikrotubuli

W procesie analizy tego typu obrazów biolodzy stawiają sobie dwa podstawowe pytania:

- Jaka jest liczba protofilamentów w danej mikrotubuli.
- Jaka jest okresowość (równomierność) występowania poszczególnych protofilamentów w danej mikrotubuli.

W niniejszym rozdziale przedstawiono wstępną analizę tych dwóch zagadnień.

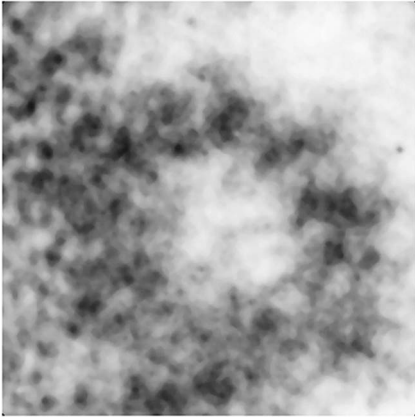


## 8.2. Liczba protofilamentów w poprzecznym obrazie mikrotubuli

Pokazany na rys. 8.1 obraz protofilamentów w poprzecznym obrazie pojedynczej mikrotubuli to obraz z mikroskopu elektronowego o powiększeniu 450 000, który został poddany wstępnej obróbce filtracji filtrem medianowym z kwadratową maską  $h$  o rozmiarze  $A \times B = 3 \times 3$ . Jest to obraz monochromatyczny  $L_{\text{GRAY}}(m, n)$ .

Poprzeczny obraz mikrotubul uzyskiwany pod mikroskopem zazwyczaj zawiera więcej niż jedną mikrotubulę lub fragmenty innych mikrotubul (rys. 8.1), co wiąże się z faktem, że obraz z mikroskopu jest prostokątem, natomiast poprzeczny obraz mikrotubuli jest zbliżony do okręgu.

Na rysunku 8.2, korzystając z sugestii autorów pracy [21], pokazano, jak w praktyce wydzielić obszar zawierający poszczególne protofilamenty należące do jednej mikrotubuli. „Zaciemniony” obszar na rysunku musi być poddany analizie, która powinna doprowadzić do odpowiedzi na dwa zasadnicze pytania postawione we wprowadzeniu do niniejszego rozdziału, czyli jaka jest liczba protofilamentów w danej mikrotubuli oraz jaka jest dokładność okresowości występowania protofilamentów w poprzecznym obrazie mikrotubuli.



Rys. 8.2. Obraz wejściowy  $L_{\text{GRAY}}(m, n)$  z zaznaczonym obszarem obejmującym protofilamenty należące do jednej mikrotubuli

Ponieważ poszczególne protofilamenty tworzące obraz pojedynczej mikrotubuli leżą na okręgu, a celem jest wyznaczenie ich liczby i okresowości, poprzeczny obraz mikrotubuli  $L_{\text{GRAY}}(m, n)$  pokazany na rys. 8.2 w współrzędnych prostokątnych  $L_{\text{GRAY}}(m, n)$  przekonwertowano do współrzędnych biegunowych  $L_b(m_b, n_b)$  zgodnie z zależnością:

$$\begin{aligned}
 L_b(m_b, n_b) &= L_b(A_o - A_{\min} + 1, i + 1) = \\
 &= L_{\text{GRAY}}(\text{round}(A_o \cdot \cos(\alpha_i)) + m_z, \text{round}(A_o \cdot \sin(\alpha_i)) + n_z),
 \end{aligned}
 \tag{8.1}$$

gdzie:

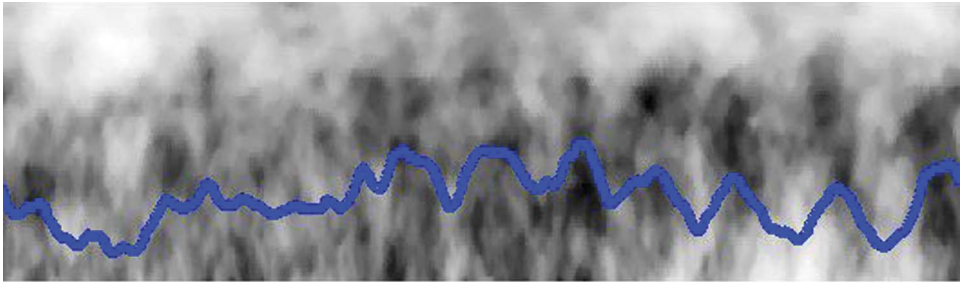
- $\alpha_i = 0,1 \cdot i$  dla  $i = 0,1, \dots, 3598, 3599$  (co daje dokładność  $0,1^\circ$  kątownego),  
 $A_0 \in (A_{\min}, A_{\max})$  — promień zaciemnionego okręgu na rys. 8.2, w których powinny się mieścić protofilamenty danej mikrotubuli,  
 round — funkcja zaokrąglająca,  
 $m_z, n_z$  — współrzędne środka poprzecznego obrazu mikrotubuli:  $m_z$  — wiersz,  $n_z$  — kolumna, wskazywane przez operatora.

Na rys. 8.3 pokazano „rozwiniecie” do postaci prostokąta zaciemnionego obszaru zawierającego protofilamenty z rys. 8.2. Jest to obraz  $L_b(m_b, n_b)$  (rys. 8.3) o rozdzielności  $M_b \times N_b = 100 \times 3600$  ( $A_{\min} = 30, A_{\max} = 130$ , co  $0,1^\circ$  kątownego).

W celu wyznaczenia przestrzennego rozkładu poszczególnych protofilamentów po okręgu obliczono wartości sumaryczne pikseli dla każdej z kolumn, zgodnie z zależnością:

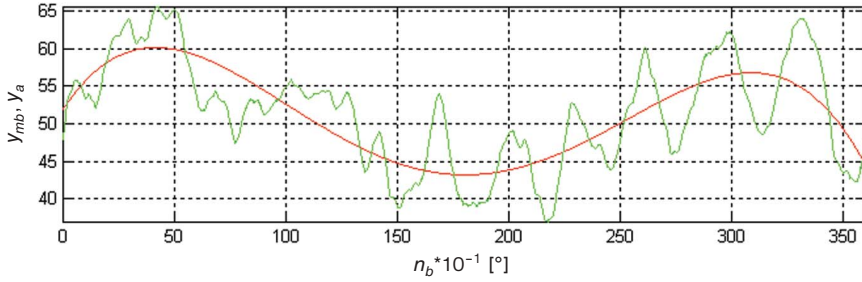
$$y_{mb}(n_b) = \sum_{m_b=1}^{M_b} L_b(m_b, n_b). \quad (8.2)$$

Na rys. 8.3 linią pogrubioną pokazano wykres  $y_{mb}(n_b)$ . Jak widać, przebieg  $y_{mb}(n_b)$  zawiera dużo szumów i zmian fazy częstotliwości wokół częstotliwości 10—18 Hz. Z prac biologów [10], [21] wynika, że tę granicę można rozszerzyć do 6—20 Hz.



Rys. 8.3. Rozwinięty do postaci prostokąta obraz  $L_b(m_b, n_b)$  (z rys. 8.2) oraz wykres funkcji  $y_{mb}(n_b)$

Na rysunku 8.4 pokazano sam wykres  $y_{mb}(n_b)$ .

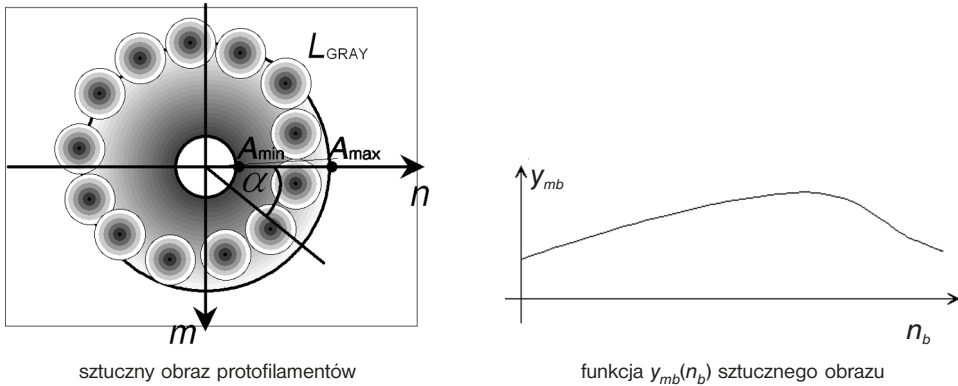


Rys. 8.4. Wykres  $y_{mb}(n_b)$  oraz jego aproksymacja  $y_a(n_b)$  (każda kolumna  $n_b$  odpowiada wartości kątowej  $0,1^\circ$   $n_b \in (1,360)$ )

Chcąc stwierdzić równomierność rozłożenia poszczególnych protofilamentów na obwodzie mikrotubuli, przeprowadzono aproksymację przebiegu  $y_{mb}(n_b)$  wielomianem trzeciego stopnia:

$$y_a(n_b) = 62,78 + 0,32 \cdot n_b + 0,0063 \cdot n_b^2 + 0,001 \cdot n_b^3. \quad (8.3)$$

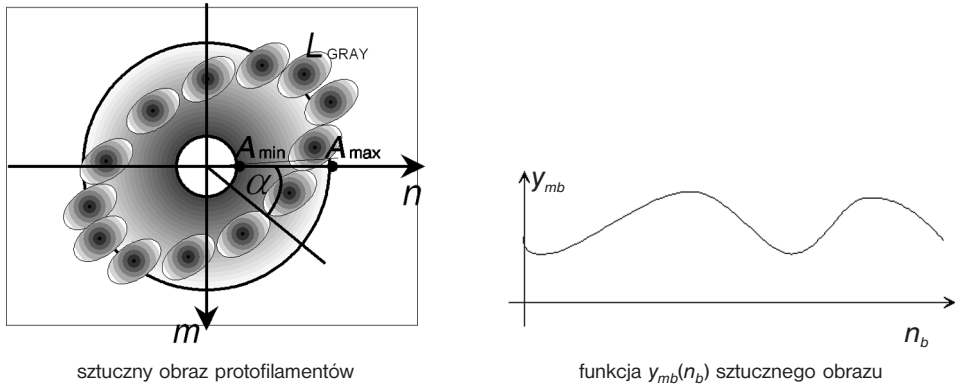
Stopień wielomianu przyjęto arbitralnie i w rozpatrywanym przykładzie można ograniczyć jego stopień do trzech. Jednak w ogólnym przypadku stałe przy największych potęgach wpływają w sposób istotny na ostateczny rezultat. Na rys. 8.4 pokazano również wykres zależności  $y_a(n_b)$ .



Rys. 8.5. Ilustracja wpływu błędu operatora związana z zaznaczeniem punktów środka ( $m_z$ ,  $n_z$ ) poprzecznego przekroju mikrotubuli

O celowości wyznaczenia funkcji aproksymacyjnej  $y_a(n_b)$  najlepiej świadczą dwa sztucznie wygenerowane przykłady rozmieszczenia protofilamentów na obwodzie mikrotubuli, co ilustrują rys. 8.5 i rys. 8.6. Funkcja aproksymacyjna  $y_a(n_b)$  pokazuje asymetrię w rozmieszczeniu protofilamentów na obwodzie mikrotubuli.

I tak, rys. 8.5 pokazuje wpływ błędu operatora związany z zaznaczeniem punktów środka ( $m_z, n_z$ ) poprzecznego przekroju mikrotubuli, natomiast rys. 8.6 uwidacznia wpływ braku osiowości ułożenia protofilamentów w poprzecznym przekroju mikrotubuli względem głównej osi mikrotubuli.

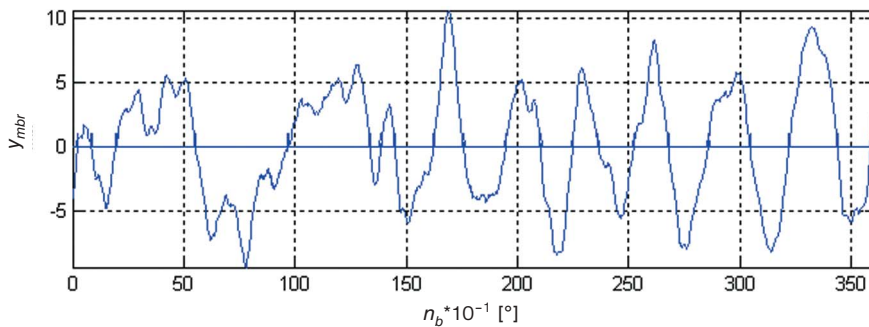


Rys. 8.6. Ilustracja wpływu braku osiowości ułożenia protofilamentów w poprzecznym przekroju mikrotubuli względem głównej osi mikrotubuli

Z rys. 8.6 wynika, że wykonując następującą matematyczną operację:

$$y_{mbr}(n_b) = y_{mb}(n_b) - y_a(n_b), \quad (8.4)$$

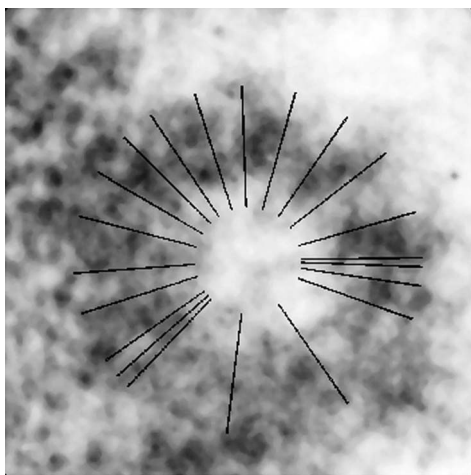
można sztucznie doprowadzić ułożenia protofilamentów w poprzecznym przekroju mikrotubuli do równomiernego ich ułożenia po okręgu względem głównej osi mikrotubuli.



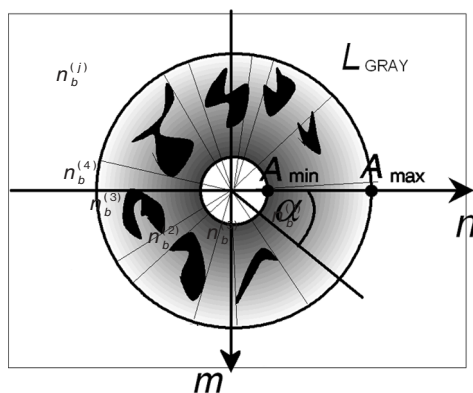
Rys. 8.7. Wykres przebiegu  $y_{mbr}(n_b)$

Na rysunku 8.7 pokazano funkcję różnicy  $y_{mbr}(n_b)$  z zaznaczonymi punktami przejścia przez zero.

Wyznaczone punkty  $n_b^{(j)}$  z przejścia przez zero funkcji  $y_{mbr}(n_b)$  wskazują na linie oddzielające poziomy nasycenia we współrzędnych biegunowych. Na tej podstawie linie przedstawione na rys. 8.8 wyznaczono poglądowo. Ich sposób powstania wyjaśnia rys. 8.9.



Rys. 8.8. Obraz wejściowy  $L_{\text{GRAY}}(m, n)$  z zaznaczonymi obszarami wyodrębnionymi w obrazie  $L_b$ , tj.  $n_b^{(j)}$



Rys. 8.9. Schemat poglądowy sposobu obliczania kąta  $\alpha$

Na rysunku 8.9 przedstawiono poglądowy schemat sposobu obliczania kąta  $\alpha$  dla sztucznego obrazu, na którym obszary zawierające protofilamenty mają charakter wklęsłych, niejednorodnych obszarów.

Uzasadnione przesłanki zatem przemawiają za wstępną filtracją przebiegu  $y_{mb}(n_b)$  obrazu  $L_{\text{GRAY}}(m, n)$  lub też za doбором narzuconego przebiegu o znanej częstotliwości, dla którego metodą optymalizacji byłyby dobierane argumenty, tak by minimalizować błąd średniokwadratowy między nim a przebiegiem  $y_{mb}(n_b)$ .

### 8.3. Okresowości protofilamentów w poprzecznym obrazie mikrotubuli

Okresowości protofilamentów w poprzecznym obrazie mikrotubuli wykonano trzema metodami:

- szybką transformatą Fouriera,
- optymalizacją simpleksową;
- filtracją za pomocą filtru Butterwortha.

#### 8.3.1. Szybka transformata Fouriera

Analizując wykres  $y_{mbr}(n_b)$  pokazany na rys. 8.7, można zauważyć okresowość dla wartości kąta od  $12^\circ$ ,  $13^\circ$ . Wartości te można łatwo odczytać, obserwując częstotliwość przecięcia się z osią  $oy$  przebiegu  $y_{mbr}(n_b)$  w obszarze kątów ( $200^\circ$ ,  $360^\circ$ ).

Nasuwa to przypuszczenie, że analiza FFT przeprowadzona nie tylko dla wspomnianego przebiegu  $y_{mbr}(n_b)$ , lecz także dla poszczególnych stopni nasycenia, dla kolejnych wierszy obrazu  $L_b(m_b, n_b)$  może przynieść oczekiwane rezultaty (widocznego maksimum amplitudy dla określonej częstotliwości). Zgodnie z tą tezę wykorzystano szybką transformatę Fouriera w postaci:

$$L_{fft}(m_f, n_f) = \quad (8.5)$$

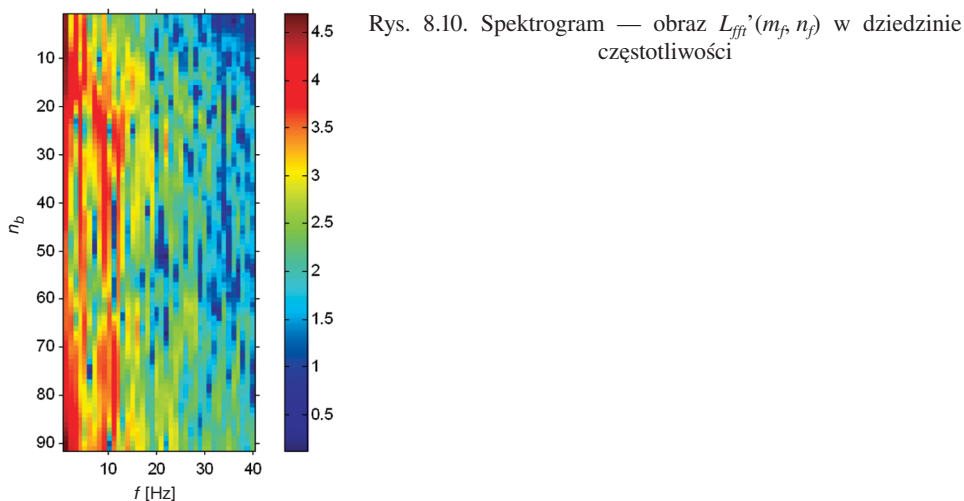
$$= \beta_L \cdot \sum_{M_b=1}^{M_b} \left[ \sum_{n_b=1}^{N_b} L_b(m_b, n_b) \cdot \exp\left(\frac{-j \cdot 2 \cdot \pi \cdot n_b \cdot n_f}{N_b}\right) \right] \cdot \exp\left(\frac{-j \cdot 2 \cdot \pi \cdot m_b \cdot m_f}{M_b}\right),$$

gdzie  $\beta_L = 1$ , oraz moduł  $f$ -obrazu, tj.:

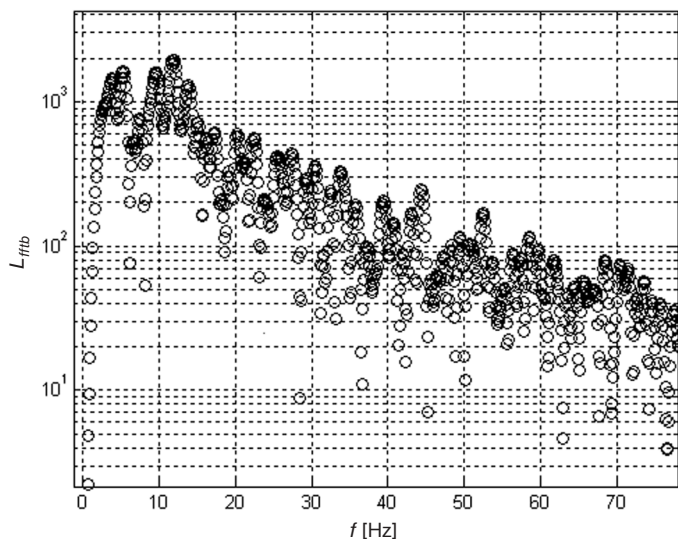
$$L_{fft}'(m_f, n_f) = \log \left( \left| L_{fft}(m_f, n_f) \right| + 1 \right). \quad (8.6)$$

Implementując ją do kolejnych wierszy obrazu  $L_b(m_b, n_b)$  oraz do przebiegu  $y_{mbr}(n_b)$ , otrzymano rezultaty przedstawione odpowiednio na rys. 8.10.

Jak wynika z  $f$ -obrazu, spektrogramu dla obrazu  $L_{fft}'(m_f, n_f)$ , przedstawionego na rys. 8.10, oraz fragmentu widma utworzonego dla przebiegu  $y_{mbr}(m_b, n_b)$ , przedstawionego na rys. 8.7, wyróżniające częstotliwości o zbliżonym poziomie



amplitudy mieszczą się w zakresie 10—15 Hz. Analiza FFT przeprowadzana zarówno lokalnie, jak i globalnie, nie przynosi oczekiwanych rezultatów, czyli wyróżnienia tylko jednej częstotliwości (spodziewanych 13 Hz).



Rys. 8.11. Wykres zmian wartości amplitudy poszczególnych harmoniczných dla przebiegu  $y_{mbr}(m_b, n_b)$  pokazanego na rys. 8.7

Uzasadnione staje się tutaj podejście, w którym narzucona zostałaby częstotliwość aproksymowanego przebiegu  $y_{mbr}$ . Realizację praktyczną tego zagadnienia przedstawiono w kolejnym podrozdziale.

### 8.3.2. Optymalizacja simpleksowa

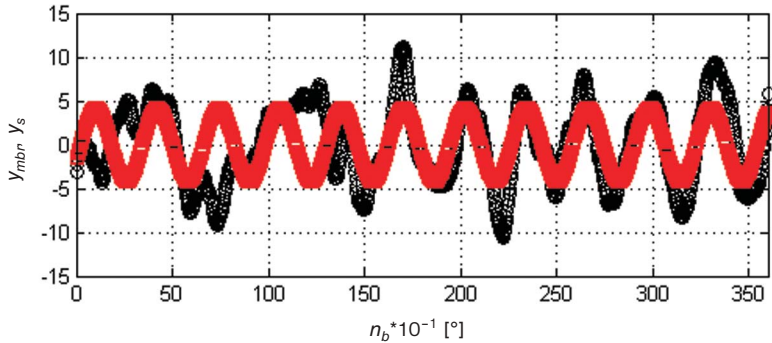
Kolejną możliwością analizy przebiegu  $y_{mbr}(n_b)$  jest narzucenie jego ogólnej postaci w formie zależności matematycznej, a następnie wyznaczenie współczynników optymalizacji. Jedną z częściej stosowanych metod optymalizacji jest optymalizowana metoda simpleksowa. Zakładając postać przebiegu zmian poziomu szarości zgodnie z funkcją sinus, tj.:

$$y_s = a_0 \cdot \sin(a_1 \cdot 2 \cdot \pi \cdot n_b + a_2), \quad (8.7)$$

oraz błąd zdefiniowany w postaci:

$$\delta_s = \sum_{n_b=1}^{N_b} |y_s(n_b) - y_{mbr}(n_b)|, \quad (8.8)$$

można uzyskać przybliżenie badanej funkcji. Na rys. 8.12 przedstawiono wykres przebiegu  $y_{mbr}(n_b)$  oraz funkcję  $y_s(n_b)$  optymalizowaną metodą simpleksową.

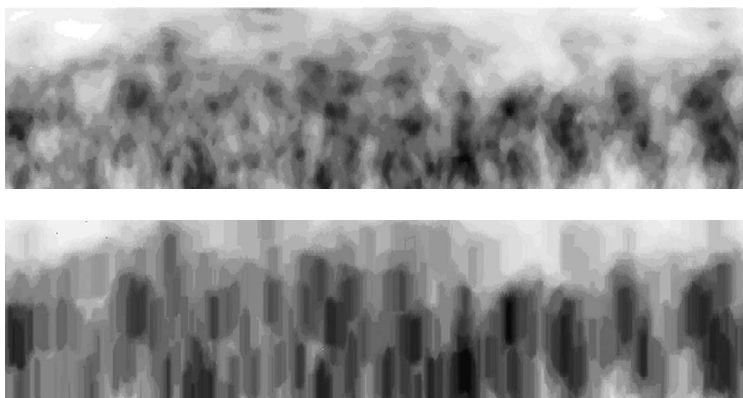


Rys. 8.12. Wykres przebiegu  $y_{mbr}(n_b)$  oraz  $y_s(n_b)$

Po przeprowadzeniu 161 iteracji z wykorzystaniem algorytmu Neldera-Meada simpleks otrzymano następujące wartości wektora:  $a = [a_0, a_1, a_2] = [-2,77, 11,026, -1,53]$ .

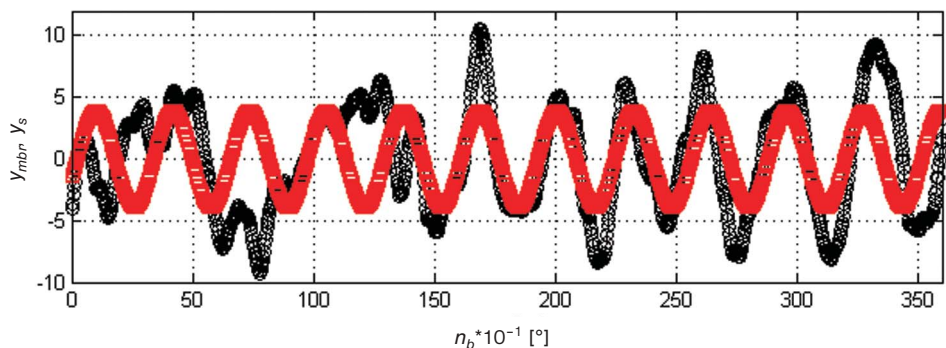
W celu zwiększenia jakości działania algorytmu na obrazie  $L_b(m_b, n_b)$  dokonano operacji erozji elementem strukturalnym SE o rozmiarze  $5 \times 5$ , otrzymując rezultaty przedstawione na rys. 8.13.





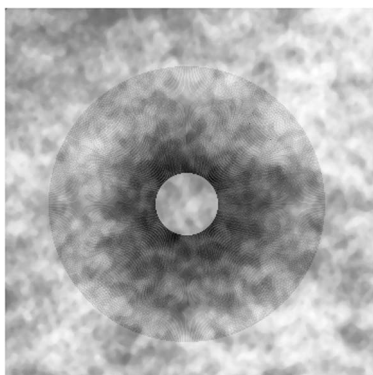
Rys. 8.13. Obraz  $L_{\text{GRAY}}(m, n)$  oraz obraz wyjściowy po operacji erozji elementem strukturalnym wierszowym z 75 elementami (SE o rozdzielczości  $76 \times 1$ )

Na rys. 8.14 pokazano wykres przebiegu  $y_{mbr}(n_b)$  oraz  $y_s(n_b)$  optymalizacji metodą simpleksową uzyskany dla obrazu  $L_b(m_b, n_b)$  po erozji wierszowym elementem strukturalnym. Udało się wydzielić 11,5 obszaru (ich liczbę można określić, wyznaczając maksima  $y_s(n_b)$ ).

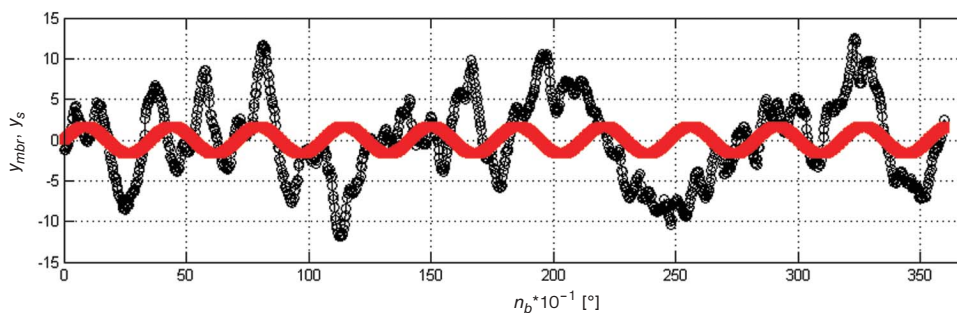


Rys. 8.14. Wykres przebiegu  $y_{mbr}(n_b)$  oraz  $y_s(n_b)$  optymalizacji metodą simpleksową uzyskany dla obrazu  $L_b(m_b, n_b)$  po erozji wierszowym elementem strukturalnym (SE o rozdzielczości  $76 \times 1$ )

Przedstawiona metoda nie daje zadowalających rezultatów w ogólnym przypadku, co ilustrują rys. 8.15 i 8.16.



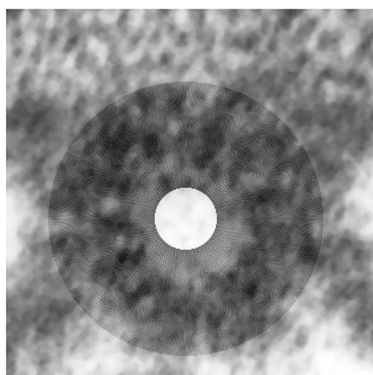
obraz wejściowy  $L_{\text{GRAY}}(m, n)$  z zaznaczonym zaciemnionym obszarem



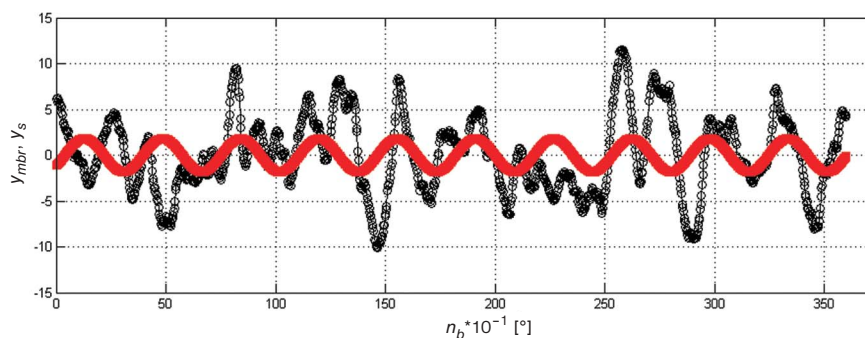
wykres przebiegu  $y_{mbr}(n_b)$  oraz  $y_s(n_b)$

Rys. 8.15. Ilustracja metody simpleksowej

Na wymienionych rysunkach pokazano przykładowo błędne rezultaty działania algorytmu.



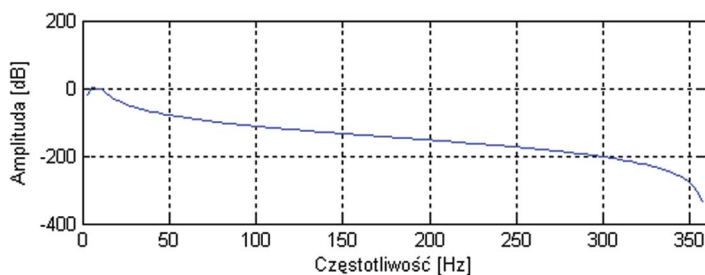
obraz wejściowy  $L_{\text{GRAY}}(m, n)$  z zaznaczonym zaciemnionym obszarem

wykres przebiegu  $y_{mb}(n_b)$  oraz  $y_s(n_b)$ 

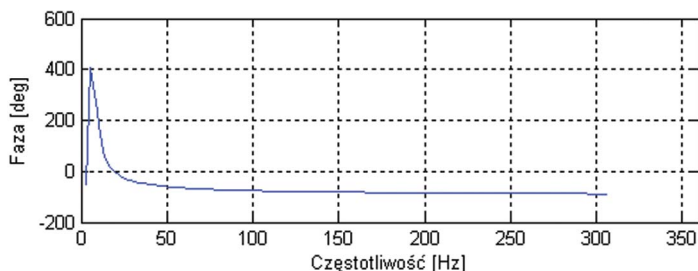
Rys. 8.16. Ilustracja metody simpleksowej

### 8.3.3. Filtracja filtrem Butterwortha

W celu eliminacji częstotliwości będących poza zakresem 6–20 Hz wykorzystano pasmowo-przepustowego filtra Butterwortha piątego rzędu o odpowiedzi impulsowej przedstawionej na rys. 8.17.



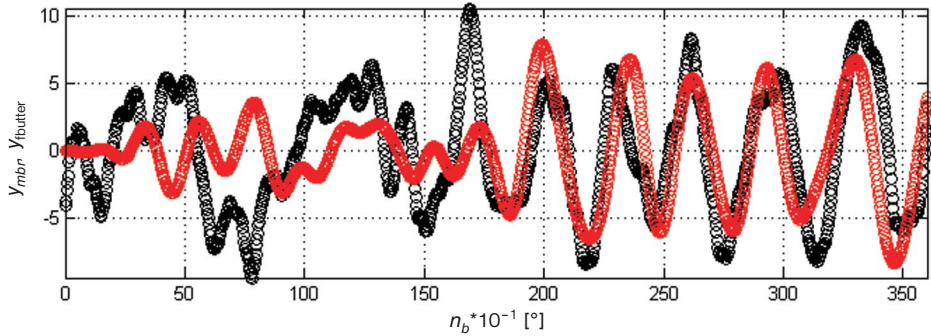
amplituda odpowiedzi impulsowej filtra Butterwortha



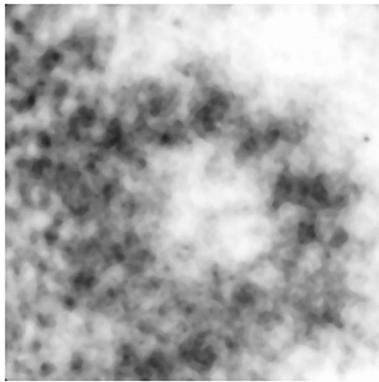
faza odpowiedzi impulsowej filtra Butterwortha

Rys. 8.17. Wykres odpowiedzi impulsowej filtra Butterwortha

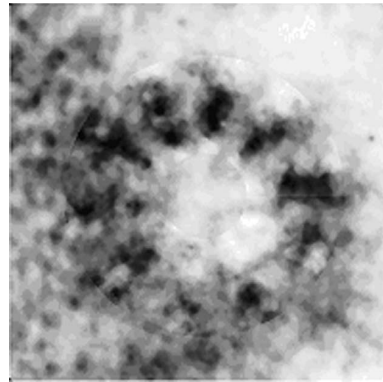
Otrzymane rezultaty dla przebiegu  $y_{mbr}(n_b)$ , będące przebiegiem po filtracji filtrem pasmowo-przepustowym, tj.  $y_{fbutter}(n_b)$ , przedstawiono na rys. 8.18.



Rys. 8.18. Wykres  $y_{mbr}(n_b)$  (kolor czarny) oraz wykres  $y_{fbutter}(n_b)$  po filtracji (kolor czerwony)



obraz wejściowy  $L_{GRAY}(m, n)$

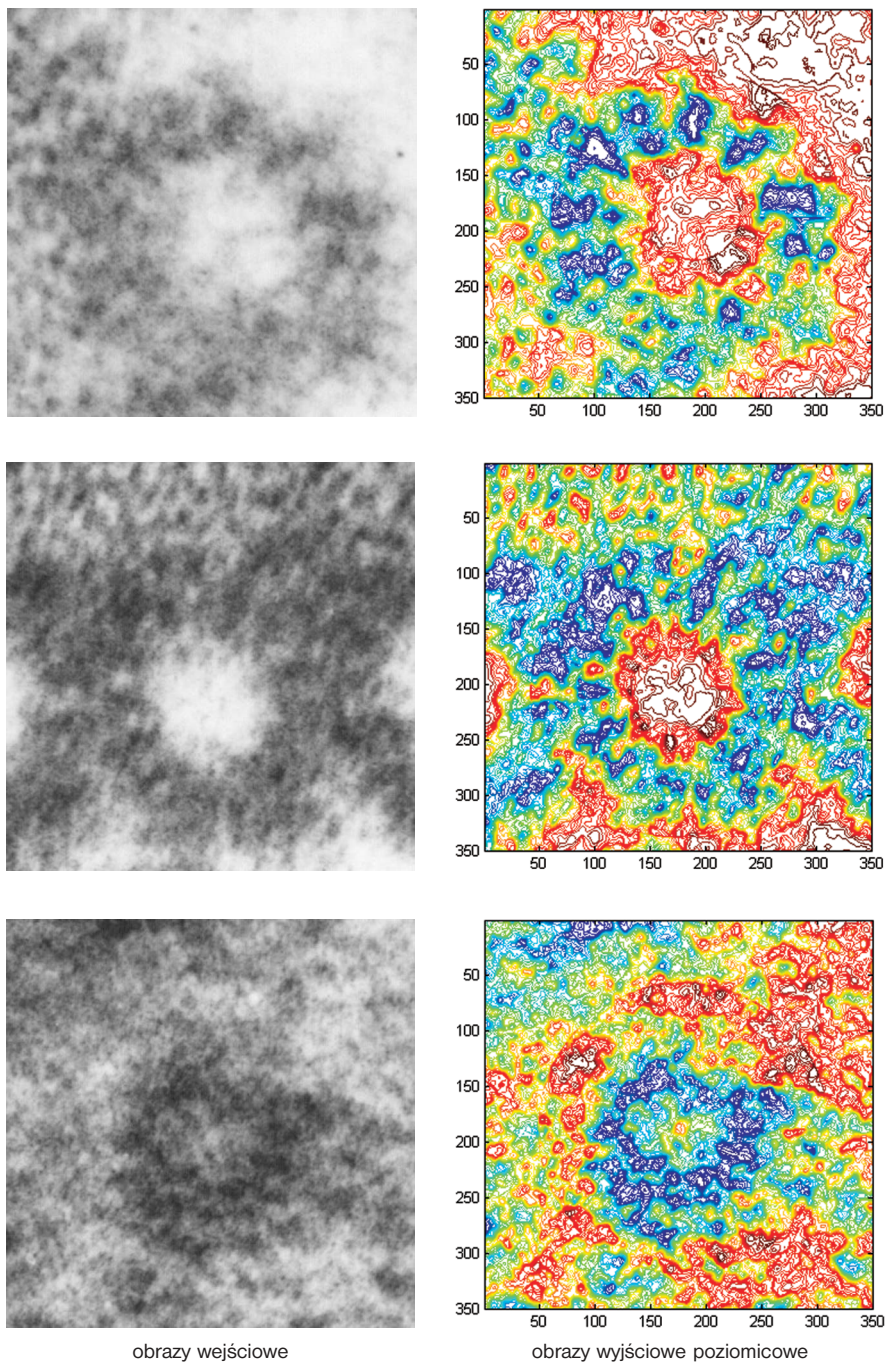


obraz  $y_{fbutter}(m, n)$

Rys. 8.19. Obraz wejściowy  $L_{GRAY}(m, n)$  z zaznaczonym uwypuklonym obszarem  $y_{fbutter}(m, n)$

Na rysunku 8.20 pokazano przykładowe obrazy wejściowe (po lewej) oraz obrazy wyjściowe z zaznaczonym uwypuklonym obszarem  $y_{fbutter}(m, n)$  w postaci kolejnych poziomic (po prawej stronie).





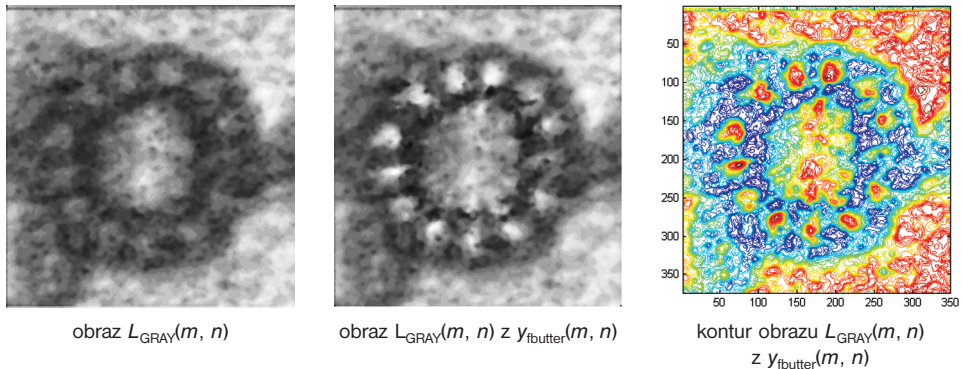
Rys. 8.20. Przykładowe obrazy wejściowe i obrazy wyjściowe z zaznaczonym uwypuklonym obszarem  $y_{\text{butter}}(m, n)$

Widoczne na rys. 8.20 wyniki potwierdzają przydatność tej metody w praktyce. Otrzymane obrazy łatwo ocenić jakościowo oraz potwierdzić na tej podstawie nie tylko tezę o liczbie protofilamentów, lecz także wskazać obszary, w których występują i są dobrze widoczne.

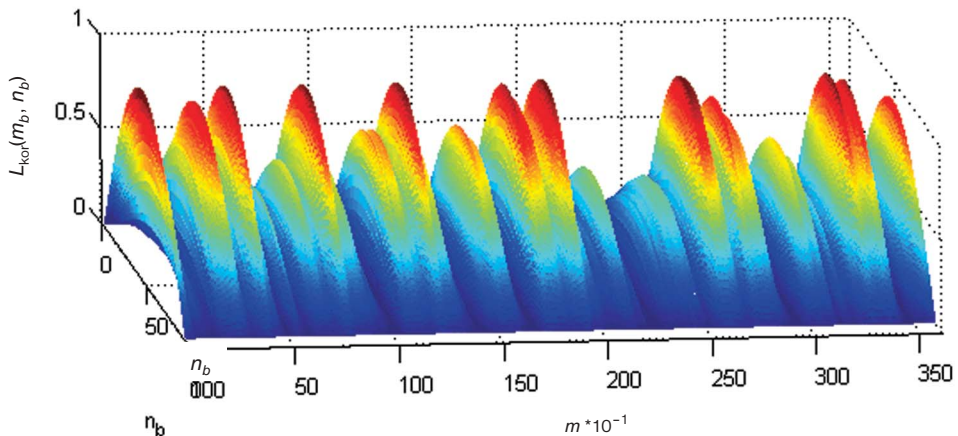
Na rys. 8.21 i 8.22 przedstawiono jeden przykład z obrazami wyjściowymi uzyskanymi dla różnych metod wizualizacji oraz obraz  $L_{kor}(m_{kor}, n_{kor})$  o rozdzielczości  $M_{kor} \times N_{kor}$ , zdefiniowany jako:

$$L_{kor}(m_{kor}, n_{kor}) = y_{fbutter}(n_{kor}) \cdot \sin\left(\frac{m_{kor} \cdot \pi}{M_{kor}}\right), \quad (8.9)$$

będący wynikiem zastosowania funkcji  $y_{fbutter}(m, n)$  zmodulowanej dla kolejnych kolumn funkcji sinus.



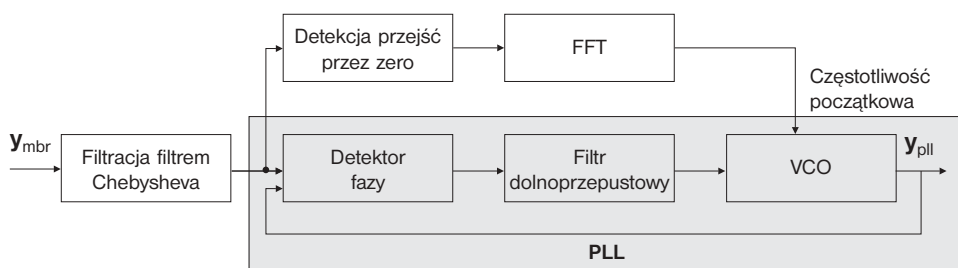
Rys. 8.21. Obraz wejściowy  $L_{GRAY}(m, n)$  oraz uzyskane wyniki w postaci obrazu z zaznaczonym uwypuklonym obszarem  $y_{fbutter}(m, n)$  oraz jego kontur ze sztuczną paletą barw



Rys. 8.22. Wykres funkcji  $L_{kor}(m_b, n_b)$

### 8.3.4. Inne możliwe podejścia

Przesłanki dotyczące okresowości występowania identyfikowanych obiektów, takie jak: całkowita liczba okresów przebiegu  $y_{mbr}$ , chwilowa zmiana fazy oraz duży poziom szumów, nasuwają przypuszczenie, że zbudowanie algorytmu analogicznego do pętli PLL stosowanej w elektronice może przynieść oczekiwane efekty. Do rezultatów z pewnością można będzie zaliczyć możliwość synchronizacji pętli przy dostatecznie niewielkim błędzie fazy. Znana będzie zatem częstotliwość występowania identyfikowanych protofilamentów oraz w konsekwencji możliwość uwypuklenia słabo widocznych obiektów. Na rys. 8.23 przedstawiono schemat blokowy pętli PLL wraz z dzielnikami częstotliwości.



Rys. 8.23. Schemat blokowy pętli PLL z obliczaniem częstotliwości początkowej  $f_0$

Działanie układu PLL polega na dostrojeniu się obwodu filtru i obserwowaniu częstotliwości występowania zmian poziomów nasycenia szarości we współrzędnych biegunowych. Detektor fazy dostraja się do narastającego zbocza sygnału  $y_{mbr}$ . Sygnał błędu z wyjścia detektora fazy, którego współczynnik wypełnienia jest funkcją różnicy faz, trafia do filtra dolnoprzepustowego, gdzie jest filtrowany. Uzyskane w ten sposób napięcie przestraja generator VCO na taką częstotliwość, by odtwarzała częstotliwość zmian poziomów szarości. Detektor przejść przez zero oraz analiza FFT służą tylko do przeprowadzenia pierwszej iteracji działania pętli w celu ustalenia początkowych warunków działania generatora VCO.

Zakładając częstotliwość  $\omega = 2 \cdot \pi \cdot 12 = 75,39$  zgodnie z częstotliwością zmian poziomów nasycenia, wynoszącą ok. 12 Hz, otrzymuje się, na podstawie [18], błąd fazy:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \varphi_b(t) = \lim_{s \rightarrow 0} \frac{1}{2} \cdot \frac{v_\omega}{s + K \cdot H(s)} = \frac{v_\omega}{\omega^2} = \frac{v_\omega}{(75,39)^2} = v_\omega \cdot 1,75 \cdot 10^{-4}, \quad (8.10)$$

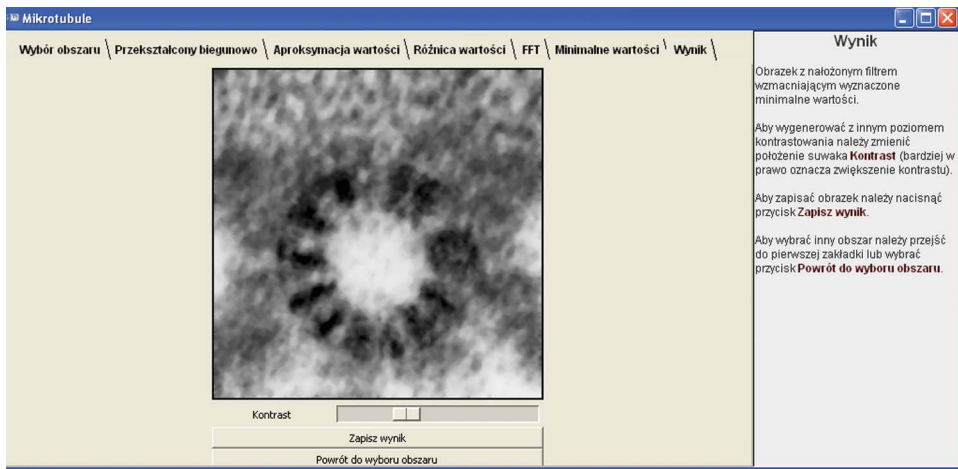
gdzie:

$K$  — wzmacnienie układu,  
 $H(s)$  — transmitancja operatorowa.

Jeżeli przyjąć, że zmiany częstotliwości sygnału  $f_{PLL}$  osiągają poziom  $v_\omega = 4 \text{ rad/s}^2$ , to zgodnie z wzorem (8.10) otrzymuje się błąd fazy równy  $7 \cdot 10^{-4}$  rad. W praktyce tak mały błąd jest dopuszczalny. Jeśli jednak zajdzie potrzeba sprowadzenia tegoż błędu do zera, to niezbędny okazuje się dodatkowy układ całkujący, włączony w szereg z filtrem dolnoprzepustowym. Otrzymuje się wówczas pętlę trzeciego rzędu, której analiza staje się bardziej skomplikowana. Stworzony algorytm oparty na analogu opisywanej pętli PLL z elektroniki stanowi dalszy zakres prowadzonych badań nad tym zagadnieniem.

## 8.4. Podsumowanie

Przedstawiona metodyka postępowania oraz zbudowane algorytmy znajdują zastosowanie praktyczne w Katedrze Biofizyki i Biologii Komórki Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Oprogramowanie współpracuje z mikroskopem, modyfikując otrzymywany obraz w opisany tu sposób, czyniąc go bardziej czytelnym i użytecznym. Główne okno programu przedstawiono na rys. 8.24.



Rys. 8.24. Główne okno programu analizy protofilamentów

Z punktu widzenia zapotrzebowania zarówno dydaktyki, jak i nauki stwarza to ogromne możliwości tworzenia dalszych aplikacji wspomagających pracę operatora. Opisywane algorytmy z pewnością nie wyczerpują w sposób dostateczny tego typu zagadnienia, stanowią jednak nowy kierunek badań nad tą problematyką.



## LITERATURA

- [1] Ahlberg J.: *A system for face localization and facial feature extraction*. Linköping University. Technical Report, No. LiTH-ISY-R-2172. Sweden 2002.
- [2] Canny J.: *A computational approach to edge detection*. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence 1986, PAMI-8, **6**: 679—698.
- [3] Cheng Y.C., Liu Y.-S.: *Polling an image for circles by random lines*. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence 2003, 25, **1**: 125—130.
- [4] Chmielewski L.J.: *Metody akumulacji danych w analizie obrazów cyfrowych*. Warszawa: Wyd. Exit 2006.
- [5] Donoho D., Huo X.: *Beamlet pyramids: A new form of multiresolution analysis, suited for extracting lines, curves, and objects from very noisy image data*. In: *Proceedings of SPIE*. Vol. 4119, July 2000.
- [6] Donoho D., Huo X.: *Beamlets and multiscale image analysis*. In: *Springer Lecture Notes in Computational Science and Engineering*. Eds. T.J. Barth, T. Chan, R. Haimes. 2001, ss. 149—196.
- [7] Duda R.O., Hart P.E.: *Use of the Hough Transformation to detect lines and curves in pictures*. Comm. of the Assoc. of Comp. Machin. 1972, **15**: 11—15.
- [8] Gorodnichy D., Malik S., Roth G.: *Affordable 3D face tracking using projective vision*. In: *Proceedings International Conference „On Vision Interface (VI'2002)”*. Calgary, 2002.
- [9] Hejnowicz Z., Romberger J.A.: *Growth tensor of plant organs*. J. Theor. Bot. 1984, **110**: 93—114.
- [10] Hejnowicz Z.: *Anatomia i histogeneza roślin naczyniowych*. Warszawa: PWN 2002.
- [11] Hejnowicz Z.: *Trajectories of principal growth directions. Natural coordinate system in plant growth*. Acta Soc. Bot. Pol. 1984, **53**: 29—42.
- [12] Hough P.V.C.: *Method and means for recognizing complex patterns*. U.S. Patent 3069654, 1962.
- [13] *Image Processing Tolbox: User's Guide*. Version 2. For Use with Matlab. MathWorks 1993—1997.
- [14] Kass M., Witkin A., Terzopoulos D.: *Snake: active contour models*. Int. J. Computer Vision 1987, **1** (4): 321—331.
- [15] Kesidis A.L., Papamarkos N.: *On the gray-scale inverse Hough transform*. Image and Vision Comput. 2000, **18**: 607—618.
- [16] Koprowski R., Wróbel Z.: *Automatic segmentation of biological cell structures based on conditional opening or closing*. Machine Graphics & Vision 2005, **14**, **3**: 285—308.

- 
- [17] Koprowski R., Wróbel Z.: *Saturation level measurement of staining reaction of cell structures*. (artykuł przyjęty do druku w Machine Graphics & Vision).
- [18] Koprowski R.: *Woltomierz z przetwarzaniem delta i transmisją światłowodową*. Arch. Praca magisterska. AGH. Kraków 1997.
- [19] Korepanov A.O.: *Central lines extraction on the diagnostic vessel images using the methods of wavelet-analysis and differential geometry*. In: 7<sup>th</sup> International Conference on Pattern Recognition and Image Analysis „New Information Technologies”. PRIA-7-2004, Vol. 3; 740—743.
- [20] Kurzyński M.: *Rozpoznawanie obrazów. Metody statystyczne*. Wrocław: Wyd. Politechniki Wrocławskiej 1997.
- [21] Kwiatkowska M., Popłońska K., Stepieński D., Hejnowicz Z.: *Microtubules with different diameter, protofilament number and protofilament spacing in „Ornithogalum umbellatum” ovary epidermis cells*. Folia Histochem. et Cytobiol. 2006, **44**, 2: 133—138.
- [22] Lacroix V., Acheroy M.: *Feature-extraction using the constrained gradient*. ISPRS Journ. of Photogrammetry and Remote Sensing. April 1998, **53**(2).
- [23] Lacroix V., Acheroy M.: *Feature-extraction using the constrained gradient*. ISPRS Journ. of Photogrammetry and Remote Sensing. April 1998, **53**(2).
- [24] Lacroix V.: *Ridge extraction*. Vision Interface, June 2001.
- [25] Lien J.J., Kanade T., Cohn J., Li C.: *Detection, tracking, and classification of subtle changes in facial expression*. Journ. of Robotics and Autonomous Systems 2000, **31**: 131—146.
- [26] Malina W., Ablameyko S., Pawlak W.: *Podstawy cyfrowego przetwarzania obrazów*. Warszawa: Wyd. Exit 2002.
- [27] Mian Z., Kassim A.A., Mannan M.A.: *Texture analysis of machined surfaces using a new hough transform*. In: *Proceedings of Texture 2002. The 2<sup>nd</sup> international workshop on texture analysis and synthesis*. Copenhagen 2002, ss. 35—41.
- [28] Neuhauser C.: *Calculus for biology and medicine*. Pearson 2004.
- [29] Nieniewski M.: *Morfologia matematyczna w przetwarzaniu obrazów*. Warszawa: Akademicka Oficyna Wydawnicza PLJ 1998.
- [30] Noronha S., Nevatia R.: *Detection and modeling of buildings from multiple aerial images*. MURI, grant No. F49620-95-1-0457 from Army Research Office awarded to Purdue University. Purdue.
- [31] Prinnet V., Monga O., Rocchisani J.M.: *Multidimensional vessel extraction using crest lines*. IEEE Conf. Eng. In Medicine and Bio. Vol. 1. 1997, ss. 393—394.
- [32] Rad A.A., Faez K., Qaragozlou N.: *Fast Circle Detection Using Gradient Pair Vectors*. In: *Proceedings of VII<sup>th</sup> Digital Image Computing: Techniques and Applications, 10—12 December 2003*. Eds. Sun C., Talbot H., Ourselin S., Adriaansen T. Sydney 2003.
- [33] Revell J.D.: *Computer vision elastography*. PhD. December 2004.
- [34] Rosenfeld S., Thurston M.: *Edge and curve detection for visual scene analysis*. IEEE Trans. Comput. 1971, C-20: 562—569.
- [35] Serra J.: *Image analysis and mathematical morphology*. Vol. 2: *Theoretical advances*. Academic Press 1988.
- [36] Song J., Cai M., Lyu M.R., Cai S.: *A new approach for line recognition in large-size images using hough transform*. International Conference on Pattern Recognition 2005.
- [37] Steger C.: *An unbiased detector of curvilinear structures*. Forschungsgruppe Bildverstehen (FG BV). Informatik IX. Technische Universität München, Technical Report EGRV-96-03. München 1996.

- [38] Stephen J., Maybank E.: *Detection of image structures using the fisher information and the Rao Metric*. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence 2004, **26**, **12**.
- [39] Tadeusiewicz R., Korohoda P.: *Komputerowa analiza i przetwarzanie obrazów*. Kraków: Fundacja Postępu Telekomunikacji 1997.
- [40] Tian Y.L., Kanade T., Cohn J.F.: *Recognizing action units for facial expression analysis*. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence 2001, **23**: 97—116.
- [41] Ting-jen Y.: *A qualitative profile-based approach to edge detection (Near-optimal detection of geometric objects by fast multiscale methods)*. PhD. New York: Department of Computer Science New York University 2003.
- [42] Tolstoy L., Parsjani H.: *Application of fourier descriptors and neural networks to schape recognition*. In: *CRC 2000 Proceeding*. Mayaguez, Puerto Rico 2002.
- [43] Turán J., Farkaš P.: *Line fitting using hough-like procedure*. Radioengin. 2001, **25**, **10**, **1**.
- [44] *Using Matlab Graphics: User's Guide*. Version 5. *For Use with Matlab 5.2*. MathWorks 1996.
- [45] *Using Matlab: User's Guide*. Version 5. *For Use with Matlab 5.2*. MathWorks 1996.
- [46] Watkins C., Sadun A., Marenka S.: *Nowoczesne metody przetwarzania obrazu*. Warszawa: WNT 1995.
- [47] Wojnar L., Kurzydłowski K.J., Szala J.: *Praktyka analizy obrazu*. Kraków: Wyd. Fotobit design 2003.
- [48] Wróbel Z., Koprowski R.: *Przetwarzanie obrazu w programie Matlab*. Katowice: Wyd. UŚ 2001.
- [49] Wróbel Z., Koprowski R.: *Praktyka przetwarzania obrazów w programie Matlab*. Warszawa: Wyd. Exit 2004.
- [50] Xu C., Prince J.L.: *Gradient vector flow: a new external force for Snake*. In: IEEE Proceedings Conference on CVPR'97, 1997, ss. 66—71.
- [51] Xu L., Oja E.: *Randomized Hough transform (RHT): basic mechanisms, algorithms, and computational complexities*. CVGIP — Image Understanding 1993, **57**, **2**: 131—154.
- [52] Yang M., Ahuja N., Kriegman D.: *Detecting faces in mages: A survey*. IEEE Transaction on Pattern Analysis and Machine Intelligence 2002, **24**(1): 34—58.
- [53] Yuanxin Z., Carragher B., Kriegman D., Clinton S.: *Potter perceptual organization as a method for detection and selection of filamentous structures in Highly Noisy Images acquired by Cryo-electron. Microscopy*. Journ. of Structural Biology 2001.
- [54] Yuille A., Hallinan P., Cohen D.: *Feature Extraction from Faces Using Deformable Templates*. Intern. Journ. of Computer Vision 1992, **8**(2): 99—111.
- [55] Zhiling L., Picone J., Rudis V.A.: *The optimization of edge and line detectors for forest image analysis*. In: *Conference Signal and Information Processing*. Mississippi: Department of Electrical and Computer Engineering, Mississippi State University 2005.
- [56] Zieliński K.W., Strzelecki M.: *Komputerowa analiza obrazu biomedycznego — wstęp do morfometrii i patologii ilościowej*. Warszawa: PWN 2002.
- [57] Żorski W., Blackledge J., Turner M.: *Fingerprint and Iris Identification Method Based on the Hough Transform*. Biul. Inst. Automatyki i Robotyki WAT 2001, **15**.

Zygmunt Wróbel, Robert Koprowski

## AUTOMATIC METHODS FOR MICROTUBULE ORIENTATION ANALYSIS

### S u m m a r y

A microtubule is a fibrous structure of 25 nm diameter and 10—25  $\mu\text{m}$  length, which is created as a result of the polymerization of the tubulin protein. The orientation of microtubules in relation to the cell axis changes due to both internal factors (associated with intracellular processes) and external ones (the gravitational field, light intensity, mechanical stresses, an electric field, etc.). In order to evaluate these changes, the inclination angle to the cell axis is usually measured.

In this monograph three developed algorithms for measuring the inclination angle to the cell axis are presented. The algorithms allowed determining a histogram of microtubule inclination angles which takes into consideration the area of microtubules. Additionally, the work covers the employment of the developed algorithms to the analysis of inclination angle variability as a kind of a trend in a cell.

The authors present a spatial, three-dimensional reconstruction of microtubules based on a sequence of images obtained with a fluorescence microscope, using the depth-of-focus change feature.

The monograph also contains an analysis of the protofilaments present in cross-sectional images of microtubules. Various possible approaches to this issue are shown.

The authors hope that their monograph will be particularly useful for biologists and confirm them in the belief that many laborious measurements can be performed with a profiled image analysis application, leaving to them the analysis of the obtained results only.

Зигмунт Врубель, Роберт Копровский

## АВТОМАТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА ОРИЕНТАЦИИ МИКРОТРУБОЧЕК

### Р е з ю м е

Микротрубочка это волокнистая структура диаметром ок. 25 nm и длиной до 10–25  $\mu$ m которая образуется в результате полимеризации белка тубулина в клетке. Ориентация микротрубочек относительно оси клетки изменяется как под влиянием внутренних факторов (связанных с внутриклеточными процессами) так и внешних факторов (поля тяготения, интенсивности освещения, механических напряжений, электрического поля и т.д.). Для оценки этих изменений обычно проводятся измерения угла наклона микротрубочек по отношению к оси клетки.

В монографии разработано три алгоритма для измерения угла наклона микротрубочек по отношению к оси клетки. Разработанные алгоритмы позволили определить гистограмму угла наклона микротрубочек с учетом полей их поверхностей. Дополнительно оговорено использование разработанных алгоритмов для анализа изменения угла наклона микротрубочек как определенного тренда в клетке.

Разработано также пространственную трехмерную модель реконструкции микротрубочек на основе секвенции изображений получаемых при помощи флюоресцентного микроскопа, используя возможности изменения резкости.

Представлено анализ периодичности протофиламентов существующих в поперечном разрезе микротрубочек. Показаны различные способы решения этого вопроса.

Авторы надеются, что разработанная монография в особенности позволит помочь биологам, давая им возможность осуществления множества трудоемких измерений при помощи разработанной профильной компьютерной программы анализа изображений, оставляя биологам только интерпретацию результатов.